



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Determinación del porcentaje de viabilidad
espermática mediante citometría de flujo durante el
proceso de criopreservación en espermatozoides
obtenidos de epidídimo de alpaca**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Javier Jesús JUÁREZ VERA

ASESOR

Alexei SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Juárez J. Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2018.



11 pr R.
52 pr A.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 16 de Agosto de 2018**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0164-EPMV/FMV-2018, integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg. Wilfredo Huanca López	Presidente del Jurado
Dr. MV. Alexei Santiani Acosta	Asesor de la Tesis
Dr. MV. César Gavidia Chucán	Miembro del Jurado
MV. Mg. Rocío Sandoval Monzón	Miembro del Jurado

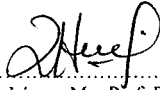
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **JUÁREZ VERA, JAVIER JESÚS** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

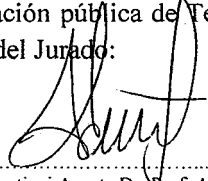
“DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN EN ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE EPIDÍDIMO DE ALPACA”

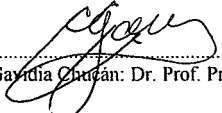
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

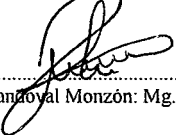
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Wilfredo Huanca López: Mg. Prof. Principal, D.E.


Alexei Santiani Acosta Dr. Prof. Asociado, T.P.


Cesar Gavidia Chucán: Dr. Prof. Principal, D.E.


Rocio Sandoval Monzón: Mg. Prof. Auxiliar, T.C.

Dedicatoria

A Dios.

Porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A la memoria de mi madre:

Dolores, por sus enseñanzas, y su inmensa comprensión...

A mi padre:

Víctor, a quien le debo todo en la vida, le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindo para culminar mi carrera profesional.

Agradecimiento

A mi asesor de tesis, el Dr. MV. Alexei Santiani Acosta, por la confianza brindada, los conocimientos impartidos, sus buenos consejos, exigencias, su tiempo y sobretodo su gran paciencia para esperar a que este trabajo pudiera llegar a su fin.

A mis compañeros de laboratorio: Brian Roman, Rodolfo Zurita y Pablo Allauca por su colaboración en la realización de la parte experimental, a ellos muchas gracias y el mejor de los éxitos en todo lo que decidan emprender.

A mi alma mater, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por todos los conocimientos y experiencias adquiridas.

CONTENIDO

RESUMEN	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Características del Semen de Alpaca	4
2.2. Características del Espermatozoide de Alpaca	6
2.3. Colección de Semen de Alpaca.....	7
2.3.1. Electroeyaculación.....	7
2.3.2. Vagina Artificial	8
2.3.3. Recuperación de espermatozoides epididimarios	8
2.4. Evaluación de la Viabilidad espermática	9
2.5. Criopreservación del Semen de Alpaca.....	11
2.5.1. Métodos de Criopreservación.....	11
2.5.2. Alteraciones de los Espermatozoides Criopreservados.....	12
2.5.3. Experiencia de la Criopreservación en Espermatozoides de Alpaca.....	13
2.6. Citometría de Flujo	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Lugar y tiempo:.....	19
3.2. Tamaño muestral:.....	19
3.3. Obtención de muestras:	20
3.3.1. Preparación del dilutor a base de leche descremada:.....	20
3.3.2. Recuperación de espermatozoides epididimarios:.....	21
3.3.3. Evaluación de Calidad Seminal (Motilidad y Concentración):.....	21
3.3.4. Diseño Experimental y Observacional:.....	22
3.3.5. Proceso de Criopreservación:	22
3.3.6. Descongelamiento:.....	23
3.3.7. Evaluación de la Motilidad Post descongelamiento:	23

3.3.8. Viabilidad Espermática:	23
3.3.8.1. Preparación de la Solución Stock de SYBR-14.....	24
3.3.8.2. Evaluación de Viabilidad Espermática	24
3.3.8.3. Lectura por Citometría de Flujo:	24
3.3.8.4. Controles de Fluorescencia	25
3.3.8.5. Análisis de la información:	26
IV. RESULTADOS.....	27
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	38
VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	39
VIII. ANEXOS.....	48

RESUMEN

El estudio de la viabilidad espermática se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide y se desconoce el efecto de la criopreservación en este parámetro. Por lo tanto, el objetivo fue determinar el porcentaje de viabilidad en espermatozoides epididimarios de alpaca antes y después del proceso de criopreservación mediante citometría de flujo. Se recolectaron 46 testículos de alpaca obtenidos del Camal Municipal de Ninacaca, Pasco. Solo se trabajaron 41 muestras con motilidad $\geq 30\%$ y una concentración espermática $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Los espermatozoides fueron recuperados de la cola del epidídimo con 1mL de dilutor a base de leche descremada, separándose luego en 2 alícuotas de 500 μ L. La primera alícuota se utilizó para la lectura inmediata en el citómetro y la segunda alícuota se congeló utilizando un sistema automático de congelamiento Cryobath, manteniéndose en nitrógeno líquido hasta su evaluación. Para la evaluación de viabilidad espermática se utilizaron los fluorocromos SYBR-14 y Ioduro de Propidio. Se tomaron 100 μ L del alícuota luego se agregó 0.5 μ L de SYBR-14 (100nM) y 0.5 μ L de Ioduro de Propidio (12 μ M), incubándose por 10 minutos a 38°C. La evaluación de viabilidad espermática se realizó mediante citometría de flujo con analizador de imágenes. Los espermatozoides viables con membrana intacta emitieron fluorescencia verde (SYBR-14) y los espermatozoides no viables con membrana dañada emitieron fluorescencia roja (Ioduro de Propidio). Mediante un análisis de T-student pareado se encontró que la viabilidad espermática inicial ($48.97 \pm 11.47\%$) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la viabilidad espermática luego del descongelamiento ($32.30 \pm 9.57\%$); adicionalmente también se encontró que la correlación entre viabilidad y motilidad espermática fue $r = 0.6737$. Por lo tanto, el proceso de criopreservación disminuye significativamente la viabilidad en espermatozoides epididimarios de alpaca estando este parámetro relacionado con la motilidad.

Palabras clave: alpaca, espermatozoide, viabilidad, SYBR-14, Ioduro de Propidio, motilidad

ABSTRACT

The study of the sperm viability is based on the analysis of sperm plasma membrane integrity and the effect of cryopreservation on this parameter is unknown. Therefore, the objective was to determine the percentage of viability on epididymal alpaca sperm before and after cryopreservation process by flow cytometry. For this, forty-six alpaca testicles were collected from the Municipal Slaughterhouse of Ninacaca, Pasco. Only Forty-one samples with a sperm motility $\geq 30\%$ and a sperm concentration $\geq 50 \times 10^6$ sperm/ml were processed. The spermatozoa were recovered from the tail of the epididymis with 1mL of skim milk-based extender, then 2 aliquots of 500 μ L were formed. The first aliquot was used for immediate reading in the cytometer and the second aliquot was frozen using an automatic system freezing Cryobath, staying in liquid nitrogen until evaluation. For the evaluation of sperm viability fluorochromes SYBR-14 and Propidium Iodure were used. From aliquots, 100 μ L were taken, and 0.5 μ L of SYBR-14 (100nM) and 0.5 μ L of Propidium Iodide (12 μ M) were also added, incubating for 10 minutes at 38°C. The evaluation of spermatic viability was assessed by flow cytometry with image analyzer. Viable sperm with intact membrane emitted green fluorescence (SYBR-14) and non-viable sperm with a damaged membrane emitted red fluorescence (Propidium Iodide). Paired Student's T-test revealed that initial sperm viability ($48.97 \pm 11.47\%$) was significantly higher ($p < 0.05$) than after thawing ($32 \pm 9.57\%$); additionally, correlation between sperm viability and motility was $r = 0.6737$. Therefore, the cryopreservation process significantly decreases the viability in epididymal alpaca sperm ad viability is related to sperm motility.

Key words: alpaca, sperm, viability, SYBR-14, Propidium Iodide, motility

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Evaluación de la viabilidad espermática de espermatozoides obtenidos de epidídimos de alpacas, frescos y descongelados, utilizando los fluorocromos SYBR-14 y PI.....	27
Cuadro 2. Evaluación de la viabilidad espermática y la motilidad a través del estudio estadístico de t de Student en muestras frescas y descongeladas de espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca.....	28
Cuadro 3. Correlación de Pearson entre la viabilidad y la motilidad, presentada en muestras frescas y descongeladas de espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema básico de la Citometría de Flujo.....	15
Figura 2. Mecanismo de acción de diversos fluorocromos empleados en la valoración de la integridad de la membrana citoplasmática.....	17
Figura 3. Esquema para la evaluación de la viabilidad espermática según la etapa de procesamiento.....	22
Figura 4. Esquema del programa #7 usado en el sistema automático de congelamiento Cryobath (Cryologic).....	23
Figura 5. Gráfico tipo Dot Plot representativo del SYBR-14/PI. Se muestran 2 poblaciones bien diferenciadas de espermatozoides.....	25
Figura 6. Gráficos Dot Plot controles obtenidos luego de la evaluación de las muestras de espermatozoides de epidídimo de alpaca utilizando los fluorocromos SYBR-14 y PI mediante citometría de flujo.....	29
Figura 7. Gráfico Dot Plot representativo y fotos de espermatozoides analizados mediante citometría de flujo.....	31
Figura 8. Correlación entre el porcentaje de viabilidad y motilidad, presentada en muestras frescas y descongeladas de espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca.....	32

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Cuadro donde se muestran todos los datos evaluados de cada muestra, y las variables halladas.....	49
ANEXO 2. Ejemplos de Dot Plot obtenidos de las muestras evaluadas con SYBR-14 y Ioduro de Propidio (PI).....	51
ANEXO 3. Imágenes de espermatozoides evaluados con SYBR-14/PI, obtenidas mediante citometría de flujo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

cm: centímetro

DMA: Dimetilacetamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

GAGs: Glicosaminoglicanos

g: gramos

INEI: Instituto Nacional de Estadística e Informática

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

mW: miliwatt

nm: nanómetro

NaCl: Cloruro de sodio

PBS: Phosphate Buffered Saline

PI: Ioduro de Propidio

μL: microlitro

μM: micromolar

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú existen 4 especies de camélidos sudamericanos de las cuales dos son domésticas, la alpaca y la llama; y dos son silvestres, la vicuña y el guanaco (Ruiz, 2011). La crianza de alpacas y llamas es una actividad de importancia económica en la mayoría de las comunidades altoandinas del Perú, Bolivia principalmente; en donde su actividad depende directamente con camélidos sudamericanos, beneficiándose también de los subproductos (Fernández Baca, 1991). Según el último Censo Nacional Agropecuario, (INEI, 2012), en nuestro territorio existen un total de 3.7 millones de alpacas distribuidas principalmente en Puno, Cuzco y Arequipa.

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial ofrecen muchas ventajas para los sistemas de producción, principalmente para el mejoramiento genético, por esta razón el interés de su aplicación en camélidos sudamericanos ha aumentado en los últimos años; sin embargo la criopreservación de espermatozoides de alpaca a pesar que se han utilizado diversos protocolos los resultados no han sido los esperados ya que la motilidad post descongelamiento en espermatozoides de semen de alpaca (Santiani *et al.*, 2005) y espermatozoides epididimarios (Morton *et al.*, 2007; Banda *et al.*, 2010) varía entre 15 a 20%; así mismo, la viabilidad e integridad acrosomal post descongelamiento ha sido inferior al 30% (Santiani *et al.*, 2005; Banda *et al.*, 2010). La alteración de la membrana plasmática es considerada como la primera causa de daño celular que interfiere el proceso de criopreservación (Parks y Graham, 1992), como consecuencia de este efecto

dañino los valores de motilidad, viabilidad espermática después de la descongelación se ven disminuidos (Rubio *et al.*, 2009).

Para la determinación de la viabilidad espermática se utilizan las técnicas de tinción que pueden ser: técnicas citoquímicas que se basan en el principio en que los espermatozoides con membrana intacta (vivos) no captan el colorante, en cambio los que poseen una membrana dañada (muertos) permiten la entrada del colorante apareciendo teñidas; entre estas tinciones tenemos la eosina, azul de tripán, azul de anilina, etc (García *et al.*, 1994). Por otro lado las técnicas fluorescentes utilizan fluorocromos que permiten determinar el estado de integridad de la membrana con mayor objetividad, se han desarrollado una gran variedad de protocolos basados en la utilización de fluorocromos (Tejerina, 2007). Entre los fluorocromos empleados tenemos el SYBR-14 que es permeable a la membrana de los espermatozoides vivos a diferencia del Ioduro de Propidio (PI) que no puede atravesar la membrana de espermatozoides vivos pero si puede penetrar y teñir el ADN de los espermatozoides muertos (Cabrita *et al.*, 2005; Paniagua *et al.*, 2006). Debido a la capacidad que tienen estos fluorocromos de atravesar la membrana se pueden utilizar ambos a la vez para la identificación de poblaciones de espermatozoides vivos y muertos (Garner *et al.*, 1994).

Este recuento de espermatozoides de cada una de las subpoblaciones se pueden realizar mediante la observación en un microscopio de epifluorescencia que posee filtros adecuados para cada uno de los fluorocromos empleados (Tejerina, 2007), pero en los últimos años la introducción de la citometría de flujo para la investigación de poblaciones espermáticas ha sido una herramienta de gran utilidad, para esto se han desarrollado muchas combinaciones de fluorocromos, que permiten analizar múltiples características espermáticas, simultáneamente en la misma muestra de semen, de una forma rápida, precisa y objetiva (Muiño, 2008).

En camélidos se han utilizado tanto técnicas citoquímicas como de fluorescencia para la evaluación de diferentes parámetros espermáticos; en alpacas Santiani *et al.* (2005) evaluaron viabilidad espermática mediante doble tinción en muestra fresca (80%) y después de la congelación (6–21%); Cheuquemán *et al.* (2013) evaluaron viabilidad espermática utilizando fluorocromos SYBR-14/PI, pero únicamente en

muestras frescas (57%). Por otro lado, tanto Banda *et al.* (2010), como Santiani *et al.* (2013) evaluaron un parámetro mixto que incluye vitalidad e integridad acrosomal. Pero de los trabajos mencionados, solo en el de Santiani *et al.* (2005) evaluaron viabilidad espermática antes y después de la congelación en alpacas utilizando una técnica antigua (Didion *et al.*, 1989).

Dado que el proceso de criopreservación es importante para la conservación de muestras de semen por tiempo indeterminado y que la citometría de flujo permite la evaluación de parámetros espermáticos como la viabilidad espermática; y al no existir estudios contundentes sobre como la criopreservación afecta la viabilidad espermática es que el presente estudio tiene por objetivo determinar el porcentaje de viabilidad en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca antes y después del proceso de criopreservación mediante citometría de flujo.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características del Semen de Alpaca

El semen consiste en espermatozoides suspendidos en un medio fluido llamado plasma seminal (Juyena y Stelletta, 2012). En alpacas el semen está compuesto de 88.5% de plasma seminal y 11.5% de espermatozoides (Garnica *et al.*, 1993). Las características del semen de camélidos sudamericanos es muy variable, se han reportado variaciones entre y dentro de individuos posiblemente debido a factores ambientales o de la especie; entre las características tenemos: una alta viscosidad (Juyena *et al.*, 2013) y filancia (Giuliano, 2012), una baja motilidad progresiva (Casaretto *et al.*, 2012), una baja concentración (Juyena *et al.*, 2013) y bajo volumen de espermatozoides (Morton *et al.*, 2008); debido a que el sitio de deposición de semen durante la cópula en alpacas es intrauterino, esto podría explicar una menor cantidad de volumen de eyaculación y baja concentración de espermatozoides en esta especie (Urquieta *et al.*, 2005).

El semen de camélidos es altamente viscoso a diferencia de otras especies, afectando la motilidad (Garnica *et al.*, 1993) y dificultando su evaluación, además es el principal impedimento para desarrollo de técnicas de reproducción asistida. La fuente de la viscosidad del semen de camélidos no ha sido documentada, aunque se ha postulado que es causado por los glicosaminoglicanos (GAGs) y/o proteoglicanos secretados por la glándula bulbouretral (Perk, 1962). Kershaw–Young y Maxwell (2012) encontraron que la proteína mucina 5B era más abundante en muestras de semen con alta viscosidad en comparación con aquellas muestras con baja viscosidad, considerando a esta proteína

como la principal responsable de la viscosidad; además las enzimas que degradan GAG no reducen completamente la viscosidad, mientras que las proteasas lo hacen, lo que sugiere que las proteínas son la causa de la viscosidad en semen de camélidos; siendo la glandula bulbouretral la fuente predominante de mucina 5B en el semen de alpacas. Además, la viscosidad del semen tiende a disminuir con el aumento del número de eyaculados en un día. Bravo *et al.*, (1997b) mencionan que la viscosidad del semen de alpaca recolectada por vagina artificial tiende a disminuir a partir del tercer eyaculado.

El volumen del semen de alpaca es muy variable, dependiendo del método de recolección; sin embargo los mejores resultados se obtuvieron con vagina artificial y fistula uretral (Hafez E y Hafez B, 2002). Debido a la ausencia de vesículas seminales los camélidos producen un bajo volumen de eyaculado que promedia de 1 – 2 mL en alpacas y llamas (Kershaw–Young y Maxwell, 2012). El volumen no se ve afectado por los días de servicio (Urquieta *et al.*, 2005), ni tampoco por la raza (Choez *et al.*, 2015b). Bravo *et al.*, (2002) observaron que las muestras de semen obtenidas por vagina artificial disminuyen en volumen cuando aumenta la frecuencia de recolección.

El color del semen de alpaca va a depender de la concentración espermática y secreción de las glándulas accesorias (Tibary y Vaughan, 2006). El color predominante es el blanco lechoso, pero a veces puede ser de color blanco cremoso (Garnica *et al.*, 1993), pero a medida que avanza los días de cruce (entre los días 1 y 12) se puede observar un aumento de muestras de traslucidas incoloras (Urquieta *et al.*, 2005). En cuanto al pH los valores se encuentran entre 7.2 a 7.5 lo cual indica que tiende a la alcalinidad (Bravo *et al.*, 1997b), reportándose que la frecuencia de los eyaculados no tienen efecto significativo sobre el valor de pH (Galindo, 1995).

Los espermatozoides de las alpacas presentan una motilidad individual que se define como un movimiento oscilatorio del flagelo (Bravo *et al.*, 1997a; Juyena *et al.*, 2013). La motilidad progresiva, como se describe en otras especies, no se puede apreciar en camélidos debido a la viscosidad del semen (Casareto *et al.*, 2012). Morton *et al.*, (2010b) mencionan que la motilidad oscilatoria se observa en muestras de alta viscosidad y muestras de baja viscosidad presentan movilidad progresiva hacia adelante.

La motilidad progresiva aumenta a medida que el eyaculado se vuelve más líquido (Tibary *et al.*, 1999).

La concentración se determina mediante el recuento de espermatozoides en un hemocitómetro y se expresa como el número de espermatozoides por mL (Bravo *et al.*, 1997a). La concentración es muy variable entre machos (82 – 250 millones de espermatozoides/mL) dependiendo de la edad, el método de recolección, la frecuencia de recolección (Tibary y Vaughan 2006); observándose que la interrupción de la cópula produce una concentración reducida (Bravo *et al.*, 2002).

2.2. Características del Espermatozoide de Alpaca

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos; estos túbulos contienen una serie compleja de células germinales en desarrollo que finalmente constituirán los gametos masculinos (Hafez E y Hafez B, 2002) en un proceso denominado espermatogénesis, el cual es un proceso complejo que implica una serie de eventos: la espermatocitogénesis en el cual las células germinales primordiales experimentan una serie de divisiones mitóticas para dar origen a las espermatogonios tipo A, estas experimentan divisiones mitóticas para diferenciarse en tipo A1 a A4, algunas de las células de tipo A4 se diferencian en espermatogonios intermedias, que luego se dividen una vez para formar espermatogonios de tipo B los cuales a través de una división mitótica van a generar a los espermatocitos primarios tetraploides los cuales se van a someter a una meiosis I para producir espermatocitos secundarios diploides; después de completar la meiosis II se forman dos espermatídes haploides de cada uno de los dos espermatocitos secundarios; luego durante la espermiogénesis las espermatídes redondas se transforman en espermatozoides por una serie de cambios morfológicos progresivos lo que implica la condensación y el alargamiento del núcleo, la biogénesis del acrosoma y la formación del flagelo; luego durante la espermiación las espermatídes alargadas que completaron la maduración y están alineadas en la superficie luminal del tubo seminífero son liberados en el lumen (Nishimura y L'Hernault, 2017). Los espermatozoides maduros son células alargadas los cuales poseen en una cabeza aplanada que contiene al núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la motilidad celular. El espermatozoide entero está cubierto por

el plasmolema o membrana plasmática. El acrosoma es una estructura que posee una doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con su cola, la cual a su vez se divide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Garner y Hafez, 2002). Los espermatozoides maduros de camélidos exhiben las mismas características anatómicas que otros mamíferos domésticos, encontrándose también anomalías espermáticas que se encuentran en otras especies que incluyen anomalías de la cabeza, pieza media y la cola. Todavía no se han determinado los efectos de las diversas anomalías en la fertilidad (Tibary y Vaughan, 2006).

2.3. Colección de Semen de Alpaca

La dificultad en la colección del semen en alpacas es atribuida debido a la postura adoptada durante la cópula, la duración de la misma (20 a 30 minutos) y el patrón de eyaculación, por lo tanto, debemos contar con una metodología que no precise la cooperación de animal, que permita extraer semen de calidad en forma repetible y que no afecte la posterior utilización del macho como reproductor (Giuliano, 2012). En la actualidad, las técnicas de recolección de semen más utilizadas son:

2.3.1. Electroeyaculación

Es una técnica de recolección de semen utilizada en una amplia variedad de animales domésticos y no domésticos (Watson, 1978), en donde una serie de estímulos eléctricos de bajo voltaje y amperaje se aplican a los nervios pélvicos a través de una sonda insertada en el recto, lo que resulta en la eyaculación. Las contracciones musculares acompañantes resultan ser extremas en algunas especies por lo tanto la técnica se lleva a cabo bajo anestesia, siendo utilizado por Director *et al.* (2007) el siguiente protocolo de anestesia una inyección intravenosa de xilazina (0.2 mg/kg) y ketamina (1.5 mg/kg). Una sonda comúnmente utilizada en ovejas y cabras podría ser utilizada para alpacas. Es importante considerar que la respuesta al estímulo eléctrico varía entre los machos; por lo tanto, el estímulo debe ser ajustado de acuerdo a la respuesta del individuo (Abraham *et al.* 2017). Por su parte la electroeyaculación permite obtener eyaculados más limpios y sin espuma, además no necesita de un

entrenamiento previo de los machos. Sin embargo la mayor desventaja que presenta es que se necesitan de profesionales y equipo especializado para realizar la anestesia general y el protocolo correcto de preparación y estimulación eléctrica (Giuliano, 2012). Choez *et al.* (2015a) encontraron que las características del semen fresco de alpacas obtenidas por electroeyaculación eran diferentes a las muestras obtenidas en otras especies de camélidos sudamericanos, esto se debe principalmente a que existe una variabilidad entre especies.

2.3.2. Vagina Artificial

Esta técnica fue implementada por primera vez en alpacas por Sumar y Leyva (1981), para lo cual construyeron un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la vagina artificial que fue una modificación de la vagina artificial usada en vacunos y ovinos, fue colocada dentro del maniquí (Pacheco, 2008). Alarcón *et al.* (2012) utilizaron el método de la vagina artificial modificada que consta de un tubo de PVC de 20 cm de largo por 4 cm de diámetro que contiene aire a presión y agua caliente que debe mantenerse entre 38 a 40°C cubriéndose con una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura constante y se colocó dentro de un maniquí; el semen puede ser recolectado de 2 formas utilizando la vagina artificial colocada dentro de un maniquí o con una hembra receptiva para lo cual se desvía el pene a la vagina artificial portátil (Abraham *et al.* 2017), una de las principales desventajas es que se necesita contar con cierta cantidad de días para el entrenamiento de los machos reportándose rechazos de alguno de ellos por indocilidad o falta de libido, además que los eyaculados suelen contener impurezas del suelo y ser muy espumosos (Giuliano, 2012).

2.3.3. Recuperación de espermatozoides epididimarios

Esta técnica tiene como objetivo la colecta de espermatozoides directamente de su reservorio, el epidídimo; la cual consiste en la separación quirúrgica de las mencionadas gónadas y la escisión longitudinal de las colas epididimarios respectivas de las cuales se extraen los espermatozoides que llevan en su interior usando como medio una solución fisiológica buferada (PBS), obteniendo al final una suspensión de espermatozoides que se toma como muestra (Santiani, 2012), una de las ventajas de este método es que los espermatozoides epididimarios no han sido expuestos al plasma seminal

proporcionando un modelo sencillo para la investigación en el laboratorio y se pueden obtener fácilmente cuando los animales son castrados o en los mataderos, también los espermatozoides epididimarios se pueden utilizar para crear bancos genéticos en especies amenazadas que han muerto súbitamente y alpacas machos muertos de alto valor genético (Morton *et al.* 2007), una desventaja de esta técnica sería el momento en que los animales son castrados ya que hay una gran variación entre la longitud media testicular y la presencia de espermatozoides en diferentes edades (Abraham *et al.* 2016).

2.4. Evaluación de la Viabilidad espermática

La viabilidad espermática es un término que generalmente se utiliza para referirse a los espermatozoides que poseen una membrana plasmática intacta. Este es un factor importante en la evaluación de la calidad del semen, ya que se requiere un plasmalema intacto para mantener las actividades metabólicas intracelulares e interactuar con la zona pelúcida y el plasmalema del ovocito para una fecundación exitosa (Bradley, 1999).

Las técnicas empleadas para la determinación de la viabilidad espermática nos permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos, basándose en el principio de que espermatozoides que presentan una membrana plasmática intacta (vivos) no permiten la entrada del colorante por mecanismos de permeabilidad selectiva, en cambio los que presentan una alteración en su membrana plasmática (muertos) el colorante penetra en el interior de la célula, apareciendo por tanto, teñidas (Almela, 2014).

Las técnicas empleadas para la evaluación de la viabilidad espermática que presentan mayor interés son las técnicas de tinción: que pueden ser las citoquímicas observables en microscopia de campo claro, ejemplo de las citoquímicas tenemos la eosina-nigrosina con la cual se evalúa la viabilidad en base a la absorción del colorante eosina por la cabeza de los espermatozoide, en donde los espermatozoides vivos no muestran una captación del colorante, mientras que los espermatozoides muertos tienen una captación parcial o completa (Vuthiphandchai *et al.*, 2009). Alarcon *et al.*, 2012 mediante la tinción eosina-nigrosina determinaron que existe un 70% y 75% de

espermatozoides viables en muestras frescas obtenidas por vagina artificial y aspiración vaginal post copula respectivamente en alpacas; otra tinción vital es la doble tinción con la cual se evalúa simultáneamente la viabilidad y la integridad acrosomal, esta tinción incluye el Azul de tripán para detectar la viabilidad y el Giemsa para detectar integridad acrosomal, en donde los espermatozoides muertos se tiñen de azul en la región postacrosomal mientras que los vivos permanecen sin teñir, los espermatozoides con acrosoma se tiñen de purpura claro a rosado mientras que los espermatozoides sin acrosoma permanecen sin teñir (Didion *et al.*, 1989). Santiani *et al.* (2005) en muestras obtenidas por vagina artificial mediante la técnica de doble tinción obtuvieron 78% de espermatozoides viables con acrosoma intacto en muestras frescas y 4–18% de espermatozoides viables con acrosoma intacto en muestras descongeladas. Banda *et al.*, (2010) en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca mediante la técnica de doble tinción obtuvieron 26–32% de espermatozoides viables con acrosoma intacto en muestras descongeladas. Santiani *et al.*, (2013) en muestras obtenidos por vagina artificial mediante la técnica de doble tinción obtuvieron 45.93% espermatozoides viables con acrosoma intacto en muestras frescas y 28–32% de espermatozoides viables con acrosoma intacto en muestras descongeladas.

Por otro lado en la actualidad el uso de las tinciones fluorescentes para determinar la viabilidad espermática se puede abordar utilizando la microscopia de fluorescencia para el cual existen fluorocromos que indican células viables y fluorocromos que indican células no viables (Gillan *et al.*, 2005) sin embargo debemos evaluar un gran número de células lo que requiere mucho tiempo, por esta razón la evaluación de la viabilidad espermática por citometría sería una mejor alternativa, porque permite analizar múltiples características espermáticas de una muestra de manera más rápida, precisa y objetiva (Muiño, 2008), entre los fluorocromos más usados para identificar la viabilidad espermática tenemos la combinación de SYBR–14 con Ioduro de Propidio (PI) que tienen como objetivo el mismo componente celular (ADN), pero difieren en su capacidad de penetrar la membrana plasmática, con el SYBR–14 los espermatozoides viables con membrana plasmática intacta emiten fluorescencia verde y los que poseen la membrana plasmática dañada el Ioduro de Propidio (PI) penetra y se teñirán de color rojo (Salinas *et al.*, 2014); esta técnica de tinción se ha usado en varias especies, en alpacas Cheuquemán *et al.* (2013) mediante citometría de flujo evaluaron viabilidad

espermática usando SYBR-14/PI obteniendo 57% de espermatozoides viables en muestras frescas obtenidas por vagina artificial.

2.5. Criopreservación del Semen de Alpaca

La criopreservación de semen es una biotecnología reproductiva muy importante, con la cual se busca promover la preservación del material genético por tiempo indeterminado, esta biotecnología está asociada a la inseminación artificial porque representa un mecanismo eficiente para la diseminación de un material genético de excelente calidad (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014). Con la criopreservación se busca mantener la viabilidad y funcionabilidad de una célula a bajas temperaturas, en donde el comportamiento de los componentes de la membrana plasmática durante el proceso de criopreservación en los periodos críticos es decir en la fase inicial del congelamiento y en la descongelación definirán los índices de supervivencia de la célula congelada (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Sin embargo, los protocolos de congelación espermática empleados en la mayoría de las especies de mamíferos, a pesar de haber sido mejorados notablemente en los últimos años, ocasionan la muerte de un gran número de células después de la criopreservación.

2.5.1. Métodos de Criopreservación

Se clasifican de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación en protocolos de congelación lenta-descongelación rápida, congelación lenta-descongelación lenta, congelación ultrarrápida y vitrificación (Boiso, 2001), en los 2 primeros la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable (Ávila-Portillo *et al.*, 2006), la descongelación lenta también se lleva a cabo mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30°C para evitar la recrystalización (Boiso, 2001). La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson en 1986, la cual implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente dimetilsulfóxido (DMSO) y sacarosa,

seguida de inmersión en nitrógeno líquido (Ávila–Portillo *et al.*, 2006). La vitrificación tampoco requiere la utilización de un congelador programable; se basa en la congelación rápida en una mezcla de altas concentraciones de crioprotectores, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un sólido amorfo, sin formación de hielo (Boiso, 2001).

2.5.2. Alteraciones de los Espermatozoides Criopreservados

En la congelación y descongelación los espermatozoides sufren procesos de deshidratación e hidratación los cuales originan cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen se observa cuando el espermatozoide es colocado dentro del dilutor que contiene crioprotectores y luego cuando es congelado, también ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen van a estar asociados a cambios de la concentración de iones y electrólitos en las soluciones intra y extra celular. La forma como ocurren estas modificaciones va determinar la mayor o menor capacidad que tiene el espermatozoide para soportar el daño al que es sometido (Stornelli *et al.*, 2005). La estructura que sufre mayor daño durante el proceso de congelación es la membrana espermática esto se debe a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, esta transición de lípidos fluidos a sólidos alteran las funciones de la membrana dándole entonces un alto grado de fragilidad; durante la deshidratación celular que sucede en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Ávila–Portillo *et al.*, 2006). Las membranas espermáticas afectadas por la criopreservación incluyen la membrana plasmática, la membrana acrosomal externa y la membrana mitocondrial (Watson, 1995) estructuras celulares importantes para la sobrevivencia y fertilidad de los espermatozoides (Câmara y Guerra, 2011). También se ha comprobado que la motilidad espermática disminuye luego de la criopreservación observándose que la mayoría de espermatozoides muestran variable grado de alteración en la motilidad, este hecho puede estar relacionado con la pobre capacidad fecundante del semen congelado (Stornelli *et al.*, 2005).

2.5.3. Experiencia de la Criopreservación en Espermatozoides de Alpaca

En alpaca (*Vicugna pacos*) el uso de técnicas como la criopreservación de gametos representa un método de manejo sostenible y facilita el estudio a nivel genético y molecular de esta especie, así como su conservación; sin embargo en comparación con otras especies de animales domésticos como toro, cerdo, oveja, caballo, cabra, etc.; hay pocas investigaciones sobre las metodologías de congelación de espermatozoides ya sea proveniente de eyaculado o de cola de epidídimo de alpaca (Suárez, 2014).

La criopreservación de semen en camélidos es una herramienta valiosa para el mejoramiento genético, ya que junto con la inseminación artificial (IA) permitirían la difusión del material genético superior; aunque existe un considerable interés en la aplicación de la inseminación artificial en alpacas este es limitado ya que la criopreservación de semen no está bien desarrollada (Morton *et al.*, 2010a); donde la alta viscosidad, la reducida concentración espermática, el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados y las dificultades en la colección de semen y en el manejo de las muestras seminales; se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación que nos brinden óptimos resultados de calidad espermática post descongelamiento; pero en los últimos años ha generado interés la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca cuyo manejo en laboratorio es mucho más satisfactorio y se pueden obtener muestras con buena concentración de espermatozoides maduros (Canorio, 2015b), además que proporcionan un modelo que elimina los efectos del plasma seminal viscoso (Morton *et al.*, 2007) y presentan un movimiento progresivo hacia adelante en contraste con la motilidad oscilatoria de los espermatozoides eyaculados

En alpacas se ha reportado un descenso considerable de la motilidad luego del proceso de criopreservación; en el caso de muestras de semen, Valdivia *et al.*, (1999) encontraron valores de 60–98% de motilidad en muestras seminales frescas que descendieron hasta 15–20% luego del descongelamiento; posteriormente en un estudio Santiani *et al.*, (2013) debido a la adición de dos análogos de superóxido dismutasa al dilutor en la criopreservación de semen obtuvieron una tasa de motilidad de 19–22% luego del descongelamiento. Morton *et al.*, (2007) fueron los primeros en reportar el

congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca obteniendo una motilidad de 18% luego del descongelamiento, posteriormente Banda *et al.*, (2010); Morton *et al.*, (2010a) obtuvieron respectivamente motilidades iniciales de 31% y 52% las cuales descendieron hasta 17% y 20.5% luego del descongelamiento.

2.6. Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica que nos permite identificar, cuantificar y separar distintas subpoblaciones celulares que se encuentran en una muestra de células en suspensión, en función de distintos patrones de tinción que son adquiridos luego del marcaje con diferentes colorantes fluorescentes, los cuales se unen a estructuras celulares específicas o acumulan selectivamente en compartimentos intracelulares (Muiño, 2008).

El principio básico de la citometría de flujo (figura 1), es simple consiste en hacer pasar células u otras partículas en suspensión las cuales son alineadas e interactúan individualmente con una fuente de luz específicamente un rayo láser, recogiendo toda la información obtenida, debido a esto es posible medir un gran número de células, en forma individual, en un corto periodo de tiempo mientras se desplazan en un sistema de flujo (500 a 4000 células por segundo). Cada célula pasa por un punto donde es impactada por un láser que emite fluorescencia a una longitud onda dependiente de cada tipo de láser, y cuya luz es desviada o alterada de acuerdo a características propias de cada célula. Esa variación de la longitud de onda producida, es captada y depurada por un complejo sistema de lentes y espejos especiales, que concentran esta luz y la transforman en pulsos de voltaje los cuales son codificados e interpretados por un computador provisto de un programa adecuado. Estos datos obtenidos pueden manejarse muy versátilmente, siendo de gran confiabilidad y exactitud (Castillo, 2005).

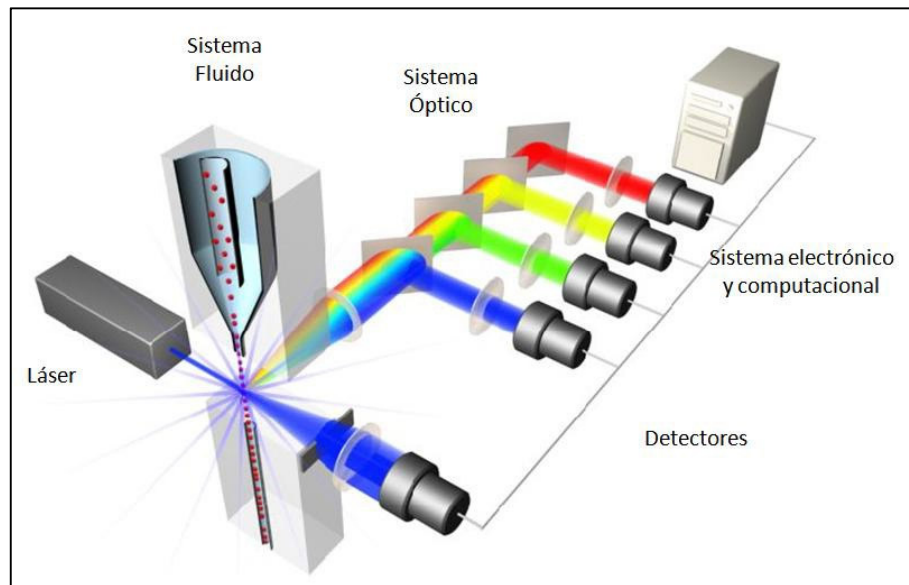


Figura 1. Esquema básico de la Citometría de Flujo.

A la suspensión celular se debe agregar un fluorocromo, el cual tendrá afinidad por algún componente celular, además este fluorocromo debe ser capaz de excitarse con el rayo láser en uso, para captarse luego un cambio en la longitud de onda de emisión del fluorocromo; el cual se traducirá en la formación de rangos o canales de fluorescencia, los cuales serán detectados facilitando así la identificación de subgrupos específicos dentro de las poblaciones celulares en periodos de tiempo cortos (Castillo, 2005).

Esta identificación mediante la citometría se ha incrementado debido al desarrollo de un gran número de fluorocromos los cuales se unen de manera específica a moléculas, se acumulan en compartimientos celulares o modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas; además con la posibilidad de poder combinar diferentes fluorocromos, se puede realizar el análisis de diferentes parámetros en forma simultánea, lo cual nos da una ventaja sobre otros sistemas de análisis celular. Estos fluorocromos que son usados para teñir las células deben tener la capacidad de absorber particulares longitudes de onda y luego mediante filtros específicos se podrá detectar la fluorescencia emitida (Givan, 2011). Esto ha convertido a la citometría de flujo en una excelente herramienta para la evaluación de las características del semen porque va a detectar en forma simultanea varios parámetros espermáticos analizando

miles de células en un corto período de tiempo (Gliozzi *et al.*, 2017), sin embargo, esta técnica no está ampliamente disponible en la práctica veterinaria (Peña *et al.*, 2018).

Entre los parámetros espermáticos más analizados en la evaluación de la calidad del semen están la viabilidad espermática, la integridad acrosomal, la funcionalidad mitocondrial, para lo cual se han desarrollado muchos métodos de tinción y combinaciones de fluorocromos, que nos van a permitir analizar de manera simultánea estos parámetros espermáticos, y como resultado, hoy en día, el uso de fluorocromos en citometría de flujo ofrece la posibilidad de analizar de manera simultánea múltiples características espermáticas dentro de una misma muestra (Muiño, 2008), además del alto rendimiento que esta técnica puede proporcionar en términos del análisis de miles de células en cuestión de segundos (Cheuquemán *et al.* 2012).

Los fluorocromos empleados para determinar la viabilidad espermática actúan de dos formas: los que indican células viables y los que indican células no viables; estos fluorocromos se clasifican en función de su mecanismo de acción (figura 2) en: fluorocromos impermeables a la membrana (como el ioduro de propidio, Hoechst 33258, homodimero de etidio, YoPro-1), que actúan ingresando dentro del espermatozoide solo cuando su membrana está dañada uniéndose específicamente al ADN, en donde los espermatozoides que son capaces de excluir estos fluorocromos se pueden considerar vivos; por otra parte tenemos los fluorocromos permeables a la membrana (como el diacetato de fluoresceína y sus derivados) que atraviesan la membrana intacta y una vez dentro son desacetiladas por esterasas intracelulares dejando su membrana impermeable, no pudiendo luego retornar al medio extracelular, quedando atrapada en el interior de la célula (Silva y Gadella, 2006); en este grupo también se encuentra el fluorocromo SYBR-14, en el cual su mecanismo de acción es distinto, este fluorocromo atraviesa la membrana y se une al ADN nuclear (Garner *et al.*, 1994).

En el caso de la diferenciación entre los espermatozoides vivos y muertos mediante tinción con SYBR-14 resulta similar a la encontrada con Hoechst 33258 ya que solo una de estas poblaciones estará teñida; en donde el SYBR-14 tiñe solamente a

los espermatozoides vivos mientras que Hoechst 33258 tiñe solamente a los espermatozoides que tienen membrana dañada (Garner *et al.*, 1994).

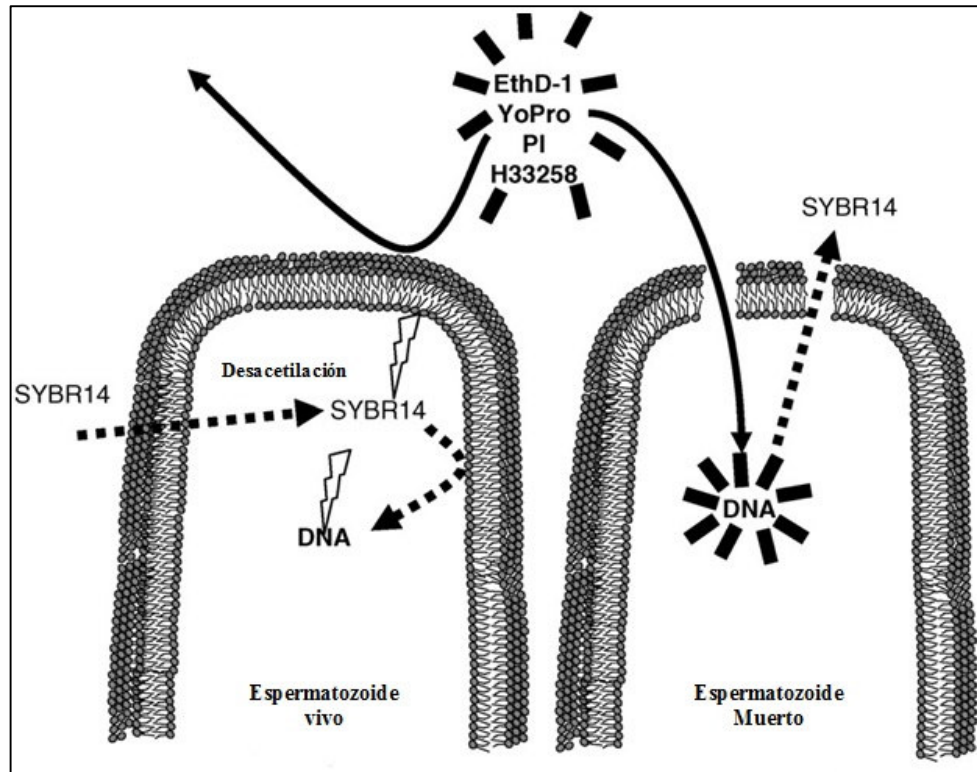


Figura 2. Mecanismo de acción de diversos fluorocromos empleados en la valoración de la integridad de la membrana citoplasmática; tanto de membrana impermeable como de membrana permeable. Adaptado de Silva y Gadella, 2006.

Sin embargo la identificación de poblaciones de espermatozoides vivos y muertos, se realiza comúnmente utilizando SYBR-14 en combinación con Ioduro de Propidio (Garner *et al.*, 1994), en donde la población constituida por espermatozoides muertos o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al Ioduro de Propidio, emitirán fluorescencia roja; en cambio la población constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al Ioduro de Propidio pero permeables al SYBR-14 emitirán fluorescencia verde; de hecho, esta combinación está disponible como el kit de viabilidad espermática LIVE/DEAD; este doble kit de tinción resultó ser útil tanto para la evaluación de viabilidad en espermatozoides recién eyaculados, como para la evaluación de viabilidad en espermatozoides congelados/descongelados; otra ventaja de estos fluorocromos es que las partículas no espermáticas, agregadas con el fin de mejorar los medios de

criopreservación (yema de huevo o leche), no necesitan ser separadas antes de realizar la evaluación; estas partículas añadidas normalmente interfieren con el análisis por citometría de flujo, pero dado que no contienen ADN, permanecerán sin marcar para ambos fluorocromos; por el contrario, tanto los espermatozoides vivos como los deteriorados siempre recogerán una de las dos sondas de unión al ADN y la emisión de fluorescencia detectada predecirá su estado de viabilidad (Silva y Gadella, 2006).

La efectividad de ambos fluorocromos SYBR-14 y PI fue demostrada en un estudio que realizaron Garner *et al.* (1994) quienes visualizaron simultáneamente poblaciones de espermatozoides vivos y muertos en semen bovino fresco y descongelado; adicionalmente Garner y Johnson (1995) también identificaron efectivamente poblaciones de espermatozoides vivos y muertos en semen de jabalíes, carneros, conejos, ratones y humanos utilizando SYBR-14 y PI mediante citometría de flujo; posteriormente Cheuquemán *et al.* (2012) y Salinas *et al.* (2014) utilizando SYBR-14 y PI evaluaron viabilidad espermática en caninos mediante citometría de flujo, obteniendo datos objetivos que les permitieron concluir que la utilización de ambos fluorocromos puede ser incorporada al análisis de rutina de semen canino. En otros estudios realizados por Minervini *et al.* (2013) demostraron también la efectividad del SYBR-14 y PI en búfalos; Paynter *et al.* (2014) utilizando SYBR-14 y PI evaluaron la calidad del semen en abejas melíferas macho identificando correctamente poblaciones de espermatozoides vivos y muertos. En la actualidad la combinación de los fluorocromos SYBR-14 y PI, para la evaluación de viabilidad espermática está siendo utilizada en diferentes especies (Gillan *et al.*, 2005) como bovinos (Kanno *et al.*, 2016), peces (Boonthai *et al.*, 2016), porcinos (Wasilewska *et al.*, 2016), equinos (Peña *et al.*, 2016), debido a su exactitud y fácil reproductividad. En el caso de alpacas Cheuquemán *et al.* (2013) evaluaron viabilidad espermática utilizando SYBR-14 y PI mediante citometría de flujo, pero solamente en muestras frescas obteniendo 57% de espermatozoides viables con membrana plasmática intacta; mencionando que actualmente existe información limitada sobre la evaluación de los parámetros espermáticos en camélidos sudamericanos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y tiempo:

Las muestras se obtuvieron del Camal Municipal del Distrito de Ninacaca, provincia de Pasco, departamento de Pasco, y fueron procesadas en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante el año 2016.

3.2. Tamaño muestral:

Para calcular el tamaño muestral se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Donde

- ❖ **n** = sujetos necesarios en cada una de las muestras.
- ❖ **Z_α** = Valor Z correspondiente al riesgo deseado (Considerando una significancia de 0.05 y un test unilateral, el Z_α es 1.645).

- ❖ Z_{β} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado (Considerando una Potencia de 0.90, el valor de Z_{β} es 1.282).
- ❖ S^2 = Varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia.
- ❖ d = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar

Calculando:

$$n = \frac{2(1.645 + 1.282)^2 * (15)^2}{(10)^2} = 38.55$$

El cálculo del tamaño muestral resultó de 38.55, pero se decidió trabajar con 41 epidídimos.

3.3. Obtención de muestras:

Se recolectaron 46 testículos que fueron obtenidos de alpacas beneficiadas. Luego del beneficio los testículos se lavaron con solución fisiológica (NaCl 0.9%) y fueron colocados en bolsas herméticas individuales junto con solución fisiológica (NaCl 0.9%) luego se almacenaron en cajas transportadoras a una temperatura de 5°C para su traslado y evaluación en Lima. Solamente se trabajaron con aquellos testículos que cumplían los requerimientos mínimos: peso ≥ 10 g y una longitud ≥ 3 cm (Abraham *et al.*, 2016).

3.3.1. Preparación del dilutor a base de leche descremada:

Se utilizó un dilutor preparado con 19 mL de leche descremada, 1 mL de yema de huevo y 0.970 g de fructosa, luego se añadió 1840 μ L del crioprotector dimetilacetamida (DMA) para llegar a una concentración final 1 M. Esta mezcla final se mantuvo temperada a 38°C.

3.3.2. Recuperación de espermatozoides epididimarios:

En el Laboratorio de Reproducción Animal de la FMV–UNMSM se retiró la túnica vaginal visceral y túnica albugínea de cada testículo, luego mediante la divulsión se separó el epidídimo para luego aislar la cola del epidídimo mediante un corte con tijera Mayo recta y pinza plana, retirando también el tejido conectivo visible y utilizando el bisel no cortante de la hoja de bisturí se corrió todo el contenido de los vasos sanguíneos para evitar la contaminación de la muestra. Realizándose luego el lavado de la cola del epidídimo con PBS, para colocarlo en una placa Petri de 10 mm temperada a 37 °C agregándose un 1mL de dilutor a base de leche descremada para permitir la liberación de los espermatozoides a través de cortes seriados. Finalmente, la suspensión fue colectada en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se mantuvo temperado a 37°C.

3.3.3. Evaluación de Calidad Seminal (Motilidad y Concentración):

Para la evaluación de la motilidad se retiraron 10 µL de cada muestra de suspensión de espermatozoides recuperados y se colocaron sobre una lámina portaobjetos temperada a 37°C, cubriéndose con un cubreobjetos y observándose en un microscopio con un objetivo 40X, calculándose el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva sobre el total de espermatozoides en cada campo, evaluándose un total de 10 campos. Para la evaluación de la concentración cada muestra de suspensión de espermatozoides recuperados, se tuvo que diluir en una proporción 1:20, para lo cual se tomaron 10 µL de la muestra y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL, previamente cargado con 190 µL de agua; luego se colocó por duplicado 10 µL de la dilución en una cámara de Neubauer, dejando sedimentar por 5 minutos para proceder a contar los espermatozoides dentro de los campos definidos en la cámara (5 cuadrantes) mediante un microscopio con un objetivo 40X; de todas las muestras trabajadas solo fueron procesadas y envasadas en pajillas de plástico de 0.25 mL, 41 muestras que presentaban una motilidad $\geq 30\%$ y una concentración $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides por mL.

3.3.4. Diseño Experimental y Observacional:

Mediante un modelo de diseño de muestras pareadas se evaluaron las 41 muestras obtenidas, dividiéndolas en 2 etapas: evaluación de muestras frescas y evaluación de muestras descongeladas (figura 3). Para cada una de las etapas cada muestra fue dividida en 2 porciones una destinada a cada una de las etapas de evaluación según su procesamiento.

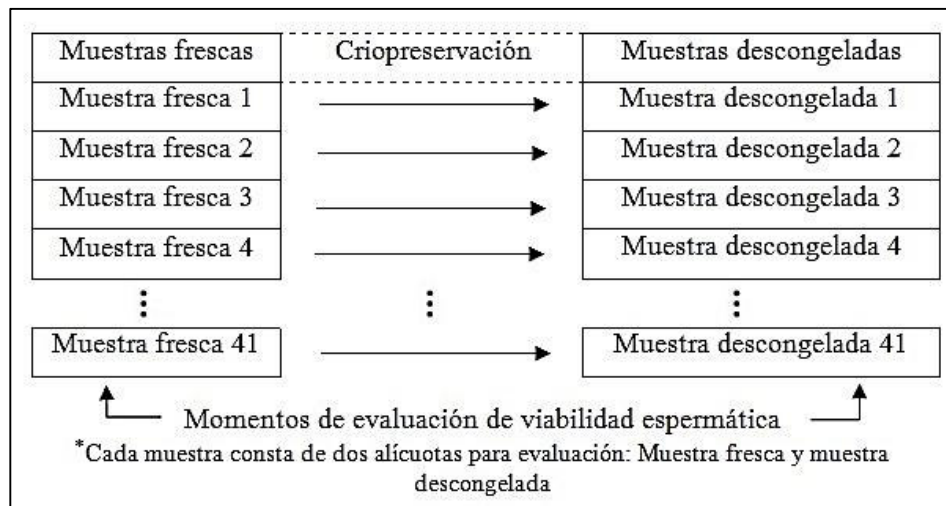


Figura 3. Esquema para la evaluación de la viabilidad espermática según la etapa de procesamiento.

3.3.5. Proceso de Criopreservación:

Para realizar el proceso de criopreservación las pajillas se colocaron en un sistema automático de congelamiento Cryobath (Cryologic) el cual contenía nitrógeno líquido, en este caso se utilizó el programa #7 (figura 4) del Cryobath, acá las muestras inician con una temperatura de 18°C disminuyendo hasta 5°C en un tiempo de 90 minutos, para luego mantenerse así por 30 minutos y después de transcurrido este tiempo seguir disminuyendo la temperatura hasta congelarse. Luego del congelamiento las pajillas fueron retiradas y colocadas inmediatamente en un tanque de nitrógeno líquido manteniéndose ahí hasta el día que se realizó la evaluación.

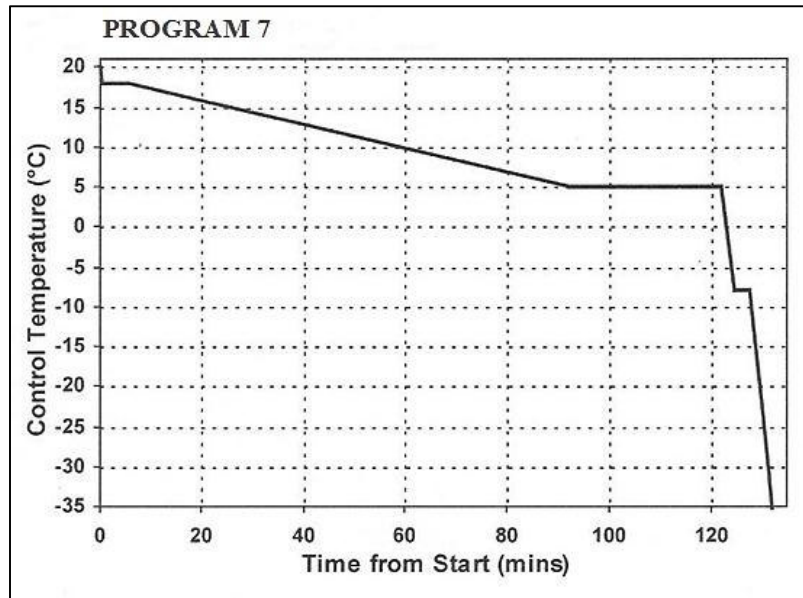


Figura 4. Esquema del programa #7 usado en el sistema automático de congelamiento Cryobath (Cryologic).

3.3.6. Descongelamiento:

Para el descongelamiento las pajillas fueron sumergidas en baño maría a 37°C por un minuto, luego fueron secadas y el contenido fue vertido en un tubo eppendorf de 1.5 mL para realizar su inmediata evaluación.

3.3.7. Evaluación de la Motilidad Post descongelamiento:

Después del descongelamiento de cada pajilla, se colocaron 10 µL de cada muestra en una lámina portaobjeto temperada a 37°C, luego se cubrió con un cubreobjetos y se evaluó la motilidad en el microscopio con un objetivo 40X.

3.3.8. Viabilidad Espermática:

La evaluación de la viabilidad espermática se realizó antes y después del proceso de criopreservación, para tal efecto cada muestra se lavó 2 veces por centrifugación con PBS a 600 gravedades por 8 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µL de PBS. Para la evaluación de este parámetro se utilizó el

LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes, Inc.) que contiene el fluorocromo SYBR-14 que emite fluorescencia verde como indicador de espermatozoides viables con membrana plasmática intacta y el fluorocromo Ioduro de Propidio (PI) que emite fluorescencia roja como indicador de espermatozoides no viables con membrana plasmática dañada.

3.3.8.1. Preparación de la Solución Stock de SYBR-14

Se preparó una solución Stock de SYBR-14, para lo cual se tuvo que diluir 100 μL del SYBR-14 (1 mM) en 4900 μL de DMSO para llegar a una concentración de 20 μM , la solución Stock de PI fue 2.4 mM. En ambos casos se procedió a homogenizar y preparar alícuotas de 50 μL guardándolas luego en congelación.

3.3.8.2. Evaluación de Viabilidad Espermática

Luego se tomó 100 μL de muestra después del lavado y se agregó 0.5 μL de Solución Stock de SYBR-14 (20 μM) para obtener una concentración final de 100 nM y se puso a incubar durante 10 minutos a 38°C, adicionalmente se colocó 0.5 μL de Solución Stock de PI (2.4 mM) para llegar a una concentración final de Ioduro de Propidio de 12 μM y se puso a incubar 10 minutos adicionales.

3.3.8.3. Lectura por Citometría de Flujo:

Todas las evaluaciones se realizaron mediante un citómetro de flujo FlowSight (Amnis, Estados Unidos) que tiene un sistema analizador de imágenes, se leyeron diez mil eventos para cada muestra. Para la excitación del SYBR-14 y el Ioduro de Propidio se utilizó un láser de longitud de onda de 488 nm a 15 mW. La emisión de la fluorescencia para el SYBR-14 fue leída utilizando el canal de detección 02 (Ch-02): (505–560 nm) y la emisión de la fluorescencia para el Ioduro de Propidio fue leída utilizando el canal de detección 05 (Ch-05): (642–740 nm). Los eventos se presentaron utilizando un gráfico tipo Dot Plot (figura 5), en donde el eje “X” midió la intensidad de fluorescencia del Ch-05 y en el eje “Y” midió la intensidad de fluorescencia del Ch-02.

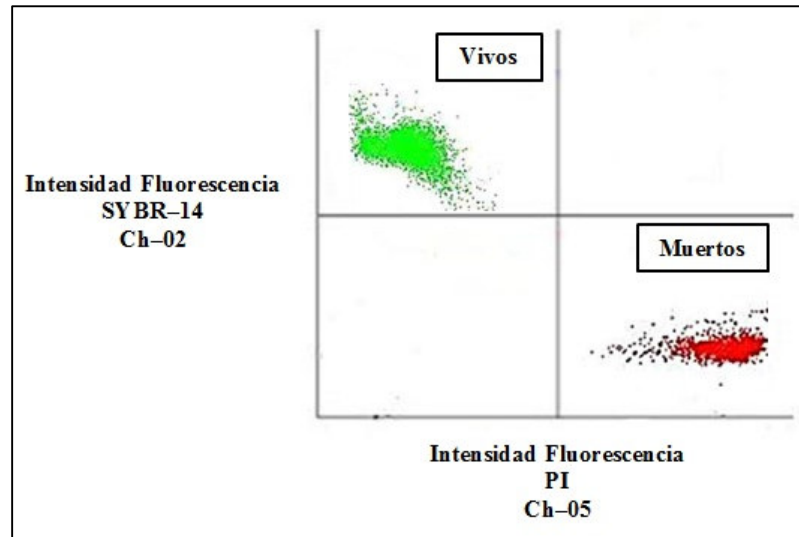


Figura 5. Gráfico tipo Dot Plot representativo del SYBR-14/PI. Se muestran 2 poblaciones bien diferenciadas de espermatozoides. En el eje X se observa la intensidad del canal Ch02 (SYBR-14) y en el eje Y la intensidad del canal Ch05 (PI).

Dado que el citómetro de flujo posee un sistema analizador de imágenes, se observaron fotos de espermatozoides vivos marcados con SYBR-14 y muertos marcados con Ioduro de Propidio (PI) en los siguientes canales:

- ❖ Ch1: Presentado en campo claro (longitud de onda: 435–505 nm)
- ❖ Ch2: Presentado en campo oscuro marcado con SYBR-14 (longitud de onda: 505–560nm)
- ❖ Ch5: Presentado en campo oscuro marcado con PI (longitud de onda: 642–745nm)
- ❖ Ch1/Ch02/Ch05: Presentado en campo claro y oscuro (longitud de onda: 435–505nm + 505–560nm + 642–745nm)

3.3.8.4. Controles de Fluorescencia

Para la corroboración de los datos fue necesario realizar los controles de autofluorescencia, control positivo del SYBR-14 y control positivo del Ioduro de Propidio (PI); los cuales serán representados en un gráfico Dot Plot.

- ❖ El control de autofluorescencia, en donde las muestras de espermatozoides fueron analizadas por citometría de flujo sin utilizar fluorocromos.
- ❖ El control positivo de SYBR-14, en donde las muestras de espermatozoides de buena calidad recién colectadas fueron analizadas por citometría de flujo utilizando solamente el fluorocromo SYBR-14.
- ❖ El control positivo de Ioduro de Propidio (PI), en donde las muestras de espermatozoides fueron inducidas a la muerte celular para luego ser analizadas por citometría de flujo utilizando solamente el fluorocromo Ioduro de Propidio (PI).

3.3.8.5. Análisis de la información:

El promedio de los porcentajes de viabilidad espermática en espermatozoides obtenidos de epidídimos de alpaca frescos y descongelados fueron analizados mediante un estudio de t-Student de muestras pareadas; además también se presentaron los datos como mediana, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza. Para determinar si los datos obtenidos siguen la distribución normal se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov (KS). Adicionalmente también fueron comparados los porcentajes de viabilidad y motilidad utilizando la prueba de coeficiente de correlación de Pearson. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism® versión 3.0.

IV. RESULTADOS

Las muestras de espermatozoides obtenidas de epidídimo de alpacas, frescas y descongeladas fueron analizadas mediante citometría de flujo para lo cual se utilizó los fluorocromos SYBR-14 y Ioduro de Propidio (PI). En el cuadro 1 se presentan los datos estadísticos obtenidos evaluando la viabilidad espermática de las muestras.

Cuadro 1. Evaluación de la viabilidad espermática de espermatozoides obtenidos de epidídimos de alpacas, frescos y descongelados, utilizando los fluorocromos SYBR-14 y PI

	Muestras frescas	Muestras descongeladas
	Viabilidad espermática	Viabilidad espermática
	(%)	(%)
Promedio	48.97	32.30
Mediana	50.30	32.90
Desviación estándar	11.47	9.57
Coefficiente de variación	23.42	29.62
Intervalo de confianza	3.62	3.02
Distribución normal	Si	Si

En el caso de las muestras frescas para la viabilidad espermática a parte del promedio y de la desviación estándar se obtuvo una mediana de 50.30%, un coeficiente de variación de 23.42% y un intervalo de confianza de 3.62%. En el caso de las

muestras descongeladas para la viabilidad espermática también aparte del promedio y de la desviación estándar se obtuvo una mediana de 32.90%, un coeficiente de variación de 29.62% y un intervalo de confianza de 3.02%.

En el cuadro 2 se presentan los valores de viabilidad y motilidad las cuales fueron obtenidos en las muestras de espermatozoides frescas y descongeladas. Con respecto a la viabilidad, se obtuvo un valor de $48.97 \pm 11.47\%$ en las muestras frescas y un valor de $32.30 \pm 9.57\%$ en las muestras descongeladas, encontrándose entre ellas una diferencia significativa al momento de analizar los valores mediante la prueba de t de Student; adicionalmente se evaluó la motilidad en donde se obtuvo un valor de $46.10 \pm 7.71\%$ en la motilidad de las muestras frescas y un valor de $24.07 \pm 6.50\%$ en la motilidad de las muestras descongeladas, encontrándose entre ellas una diferencia significativa al momento de analizar los valores mediante la prueba de t de Student.

Cuadro 2. Evaluación de la viabilidad espermática y la motilidad a través del estudio estadístico de t de Student en muestras frescas y descongeladas de espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca

	Muestras de espermatozoides frescos	Muestras de espermatozoides descongelados
Viabilidad Espermática	48.97 ± 11.47^a	32.30 ± 9.57^b
Motilidad	46.10 ± 7.71^a	24.07 ± 6.50^b

Los datos son presentados como promedios \pm desviación estándar

^{a, b} Letras diferentes dentro de una fila indican diferencia estadística significativa $p < 0.005$

En la figura 6 se observan gráficos Dot Plot controles obtenidos luego de la evaluación de las muestras de espermatozoides de epidídimo de alpacas mediante la citometría de flujo. En (A) se observa el control de autofluorescencia, en donde todos eventos se encuentran formando una sola población en el cuadrante inferior izquierdo, que es lo que se espera ver en una muestra sin fluorocromos; en (B) se observa el control positivo del fluorocromo SYBR-14, emitiendo fluorescencia en el canal Ch02 en donde todos los eventos se encuentran formando una sola población en el cuadrante superior izquierdo; en (C) se observa el control positivo del fluorocromo Ioduro de

Propidio (PI), emitiendo fluorescencia en el canal Ch05 donde todos los eventos se encuentran formando una sola población en el cuadrante inferior derecho.

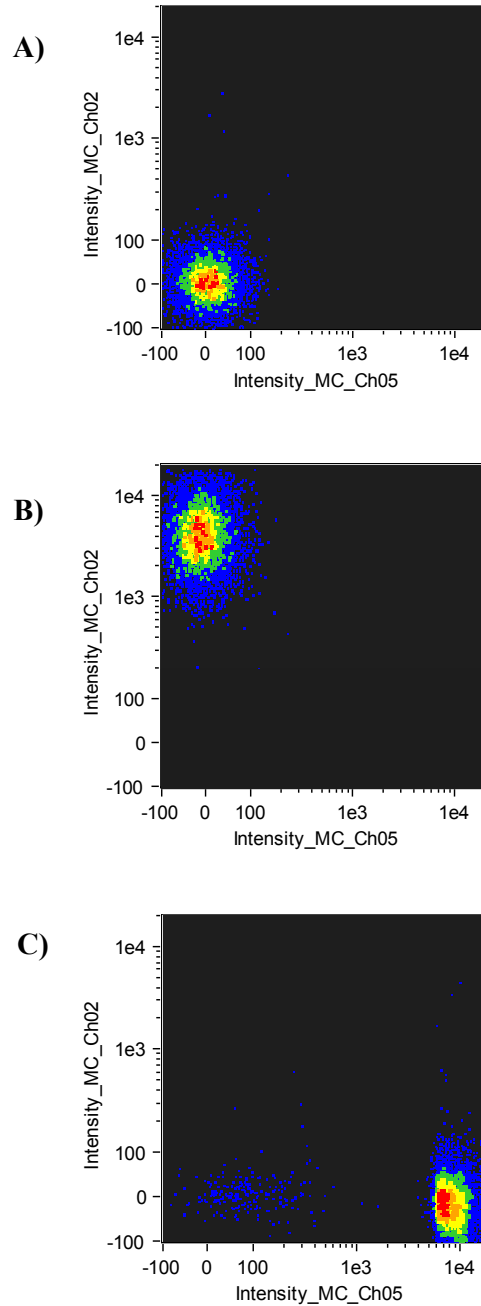
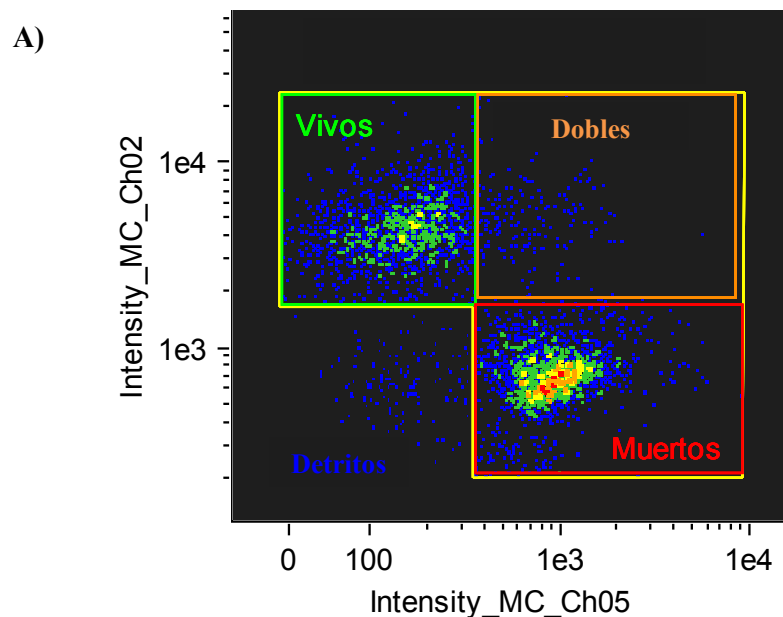


Figura 6. Gráficos Dot Plot controles obtenidos luego de la evaluación de las muestras de espermatozoides de epidídimo de alpaca utilizando los fluorocromos SYBR-14 y PI mediante citometría de flujo. (A) Control de autofluorescencia, donde las muestras de espermatozoides fueron analizadas sin utilizar fluorocromos. (B) Control positivo del SYBR-14 para obtener espermatozoides vivos. (C) Control positivo del Ioduro de Propidio (PI) para obtener espermatozoides muertos.

En la figura 7 se observan un gráfico Dot Plot representativo y fotos de espermatozoides analizados mediante citometría de flujo. En (A) se observa un Dot Plot representativo de espermatozoides frescos y descongelados utilizando los fluorocromos SYBR-14 y Ioduro de Propidio (PI) donde aparecen cuatro poblaciones claramente diferenciadas, en el eje Y observamos la intensidad del canal Ch02 (SYBR-14) y en el eje X observamos la intensidad del canal Ch05 (PI). En (B) se observan espermatozoides representativos de la población del cuadrante superior izquierdo del Dot Plot que corresponden a los espermatozoides vivos los cuales emiten fluorescencia verde por el SYBR-14. En (C) se observan espermatozoides representativos de la población del cuadrante inferior derecho del Dot Plot que corresponden a los espermatozoides muertos los cuales emiten fluorescencia roja por el Ioduro de Propidio (PI). En (D) se observan espermatozoides representativos de la población del cuadrante superior derecho del Dot Plot que corresponden a espermatozoides vivos y muertos los cuales emiten fluorescencia verde y roja respectivamente. En (E) se observan muestras representativas de la población del cuadrante inferior izquierdo del Dot Plot que corresponde a los detritos los cuales no emiten fluorescencia.



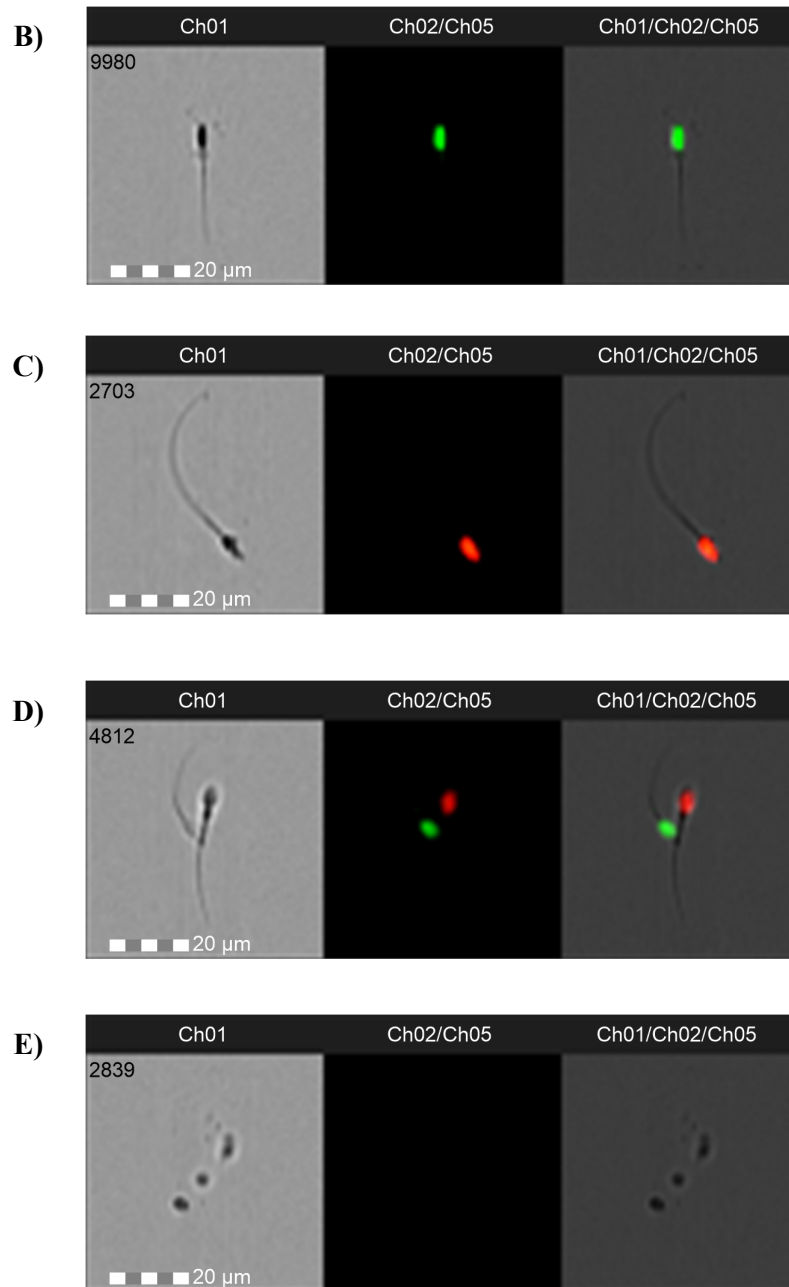


Figura 7. Gráfico Dot Plot representativo y fotos de espermatozoides analizados mediante citometría de flujo. En (A) se observa un Dot Plot representativo de espermatozoides utilizando los fluorocromos SYBR-14/PI. En (B) se observan espermatozoides representativos del cuadrante superior izquierdo del Dot Plot que emiten fluorescencia verde por el SYBR-14. En (C) se observan espermatozoides representativos del cuadrante inferior derecho del Dot Plot que emiten fluorescencia roja por el Ioduro de Propidio (PI). En (D) se observan espermatozoides representativos del cuadrante superior derecho del Dot Plot donde se encuentran espermatozoides vivos y muertos emitiendo fluorescencia verde y roja respectivamente. En (E) se observan muestras representativas del cuadrante inferior izquierdo del Dot Plot el cual corresponde a los detritos los cuales no emiten fluorescencia.

En el cuadro 3 se presenta el análisis de correlación de Pearson entre los valores porcentuales obtenidos entre viabilidad y motilidad espermática presentada en muestras frescas y descongeladas (figura 8). Se obtuvo una correlación moderada positiva significativa ($p < 0.0001$) con un $r = 0.6737$.

Cuadro 3. Correlación de Pearson entre la viabilidad y la motilidad, presentada en muestras frescas y descongeladas de espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca

Parámetros espermáticos	Correlación de Pearson		Pares (n)
	r	p	
Viabilidad vs Motilidad	0.6737	$p < 0.0001$	82

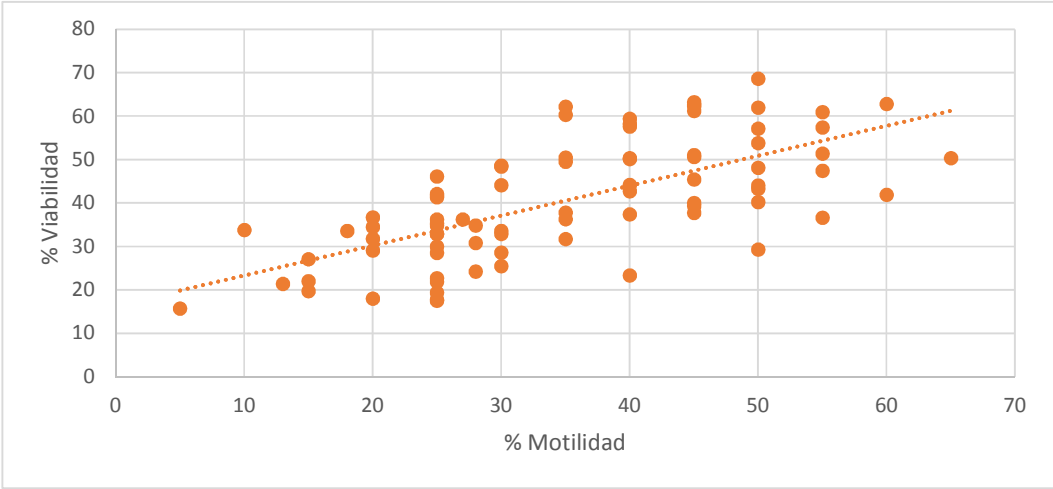


Figura 8. Correlación entre el porcentaje de viabilidad y motilidad, presentada en muestras frescas y descongeladas de espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca.

V. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que nos presenta como los porcentajes de viabilidad en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca disminuyen significativamente luego del proceso de criopreservación, los cuales fueron analizados por citometría de flujo con analizador de imágenes, utilizando los fluorocromos SYBR-14 y Ioduro de Propidio (PI).

En este trabajo la viabilidad espermática inicial estuvo alrededor del 48%, este resultado es menor a los reportados por Santiani *et al.* (2005) y Cheuquemán *et al.* (2013) que obtuvieron respectivamente 80% y 57% de espermatozoides viables, esta diferencia se puede deber a que en estos trabajos las muestras de semen provenían de un núcleo de reproductores a diferencia de nuestro estudio en el cual las muestras provenían de animales de camal. En otro trabajo Santiani *et al.* (2013) obtuvieron una viabilidad espermática inicial de 45% cuyo valor es similar al obtenido en este estudio, esta similitud de resultados se podría deber a que Santiani *et al.* (2013) también utilizaron muestras de animales de descarte. Adicionalmente el método de colección también podría influir ya que en el trabajo de Santiani *et al.* (2013) las muestras de semen fueron colectadas utilizando vagina artificial, en cambio en este estudio se trabajó con espermatozoides obtenidos del epidídimo en los cuales no hay efecto de plasma seminal, esto se puede explicar porque el plasma seminal tendría un efecto perjudicial sobre la viabilidad espermática (Way *et al.*, 2000). A todo esto se tendría que agregar que aparentemente la época del año no estaría influenciando en la diferencia de los valores porque en los cuatro trabajos mencionados las muestras se colectaron entre

los meses de enero y mayo que corresponden al periodo de mayor actividad productiva (Urquieta *et al.*, 1991).

Luego del proceso de criopreservación, en las muestras descongeladas se observó una disminución de la viabilidad espermática hasta el 32%. Este resultado es aparentemente mayor a los reportados por Santiani *et al.* (2005), Banda *et al.* (2010) y Santiani *et al.* (2013) que obtuvieron respectivamente 21%, 27% y 28% de espermatozoides viables después de la descongelación, esta aparente menor disminución de la viabilidad se puede deber a que si bien en los tres trabajos utilizaron dilutor a base de leche descremada se cambió el crioprotector, utilizándose en el trabajo de Santiani *et al.* (2005), Banda *et al.* (2010) y Santiani *et al.* (2013) etilenglicol y en este estudio se utilizó dimetilacetamida (DMA), demostrándose en el trabajo de Choez *et al.* (2014) que el etilenglicol no ofrece buenos resultados, en cambio Canorio *et al.* (2015a) indican que la dimetilacetamida (DMA) ofrece mejores resultados de viabilidad espermática después de la descongelación. Sin embargo en el mismo trabajo de Santiani *et al.* (2013) se han encontrado valores de 30% y 32% de viabilidad espermática después de la descongelación esta mejora se puede deber a la adición de un análogo de superóxido dismutasa en las muestras, lo cual implicaría que algunos de los factores involucrados en mantener la viabilidad espermática en alpacas serían los crioprotectores y los antioxidantes; ya que se ha demostrado (Evangelista–Vargas y Santiani, 2017) que existe un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por los espermatozoides durante el proceso de criopreservación; por lo que tanto las especies reactivas de oxígeno (ROS), los antioxidantes y los crioprotectores son factores que están afectando la viabilidad espermática.

En este trabajo estamos demostrando que la criopreservación afecta negativamente la viabilidad espermática. Además de los factores como el efecto tóxico de los crioprotectores, la producción de especies reactivas de oxígeno; existen otros factores que podrían estar causando pérdida de la viabilidad espermática: como la velocidad de congelación en donde si es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido aumentará el shock de frío ya que el enfriamiento rápido induce un estrés letal (Stornelli *et al.*, 2005), este fenómeno, afecta de manera variable a varias especies, por lo cual el enfriamiento antes de la criopreservación se debe realizar con mucho

cuidado (Watson, 2000). También los ciclos de deshidratación e hidratación a los que son sometidos los espermatozoides cuando son congelados y descongelados resultan en cambios significativos de volumen que están asociados a cambios de concentraciones de iones y electrolitos en las soluciones intra y extracelular (Stornelli *et al.*, 2005).

Adicionalmente se ha observado que en todos los trabajos que han utilizado semen de alpaca para congelar la viabilidad espermática inicial es reducida comparando con otros mamíferos domésticos como en bovinos 82% (Li *et al.*, 2016), equinos 80% (Love, 2016), o porcinos 86% (Dziekońska *et al.*, 2017). Esto podría deberse a las características propias del semen de camélidos: bajo volumen, alta viscosidad, bajo número de espermatozoides, diferencias espermáticas entre machos y entre eyaculados del mismo macho (Morton *et al.*, 2008).

En este trabajo para la determinar la viabilidad espermática en muestras frescas y descongeladas de alpacas se utilizó los fluorocromos SYBR-14 y Ioduro de Propidio (PI), que también fueron utilizados por Cheuquemán *et al.* (2013) para evaluar la viabilidad espermática pero solamente en muestras frescas de alpacas. En donde el SYBR-14 es un fluorocromo que atraviesa la membrana intacta, una vez dentro es desacetilado por esterasas intracelulares para luego unirse al ADN y emitir una fluorescencia verde, mientras que el Ioduro de Propidio (PI) es un fluorocromo impermeable a la membrana con afinidad al ADN, que atraviesa la membrana solo cuando está dañada y se une específicamente al ADN para emitir una fluorescencia roja (Silva y Gadella, 2006). Garner y Johnson (1995) demostraron la eficacia del SYBR-14 y Ioduro de Propidio (PI) en la identificación de poblaciones de espermatozoides vivos y muertos en el semen de toros, jabalíes, carneros, conejos, ratones y humanos, cuantificándose fácilmente mediante la citometría de flujo. En la actualidad se sigue usando el SYBR-14/Ioduro de Propidio (PI) para la determinación de la viabilidad espermática en otras especies como búfalos (Minervini *et al.*, 2013), caninos (Salinas *et al.*, 2014), abejas (Paynter *et al.*, 2014), bovinos (Kanno *et al.*, 2016), peces (Boonthai *et al.*, 2016), porcinos (Wasilewska *et al.*, 2016), equinos (Peña *et al.*, 2016).

Con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo se encontró que los promedios de la viabilidad espermática en muestras frescas y descongeladas fueron

48.97% y 32.30% respectivamente en donde la mediana obtenida en muestras frescas y descongeladas fue 50.30% y 32.90% respectivamente estos valores son muy cercanos a sus respectivos promedios lo cual se debe a que los resultados siguen la distribución normal. Aparte del promedio también se obtuvo la desviación estándar que fue 11.47% y 9.57% en muestras frescas y descongeladas respectivamente, el cual indica que tan dispersos están los datos con respecto al promedio, es decir nos permite determinar entre que rangos 48.97 ± 11.47 y 32.30 ± 9.57 pueden moverse los valores de viabilidad espermática de las muestras frescas y descongeladas respectivamente. También se halló el coeficiente de variación en muestras frescas y descongeladas cuyo valor fue 23.42% y 29.62% respectivamente, el cual nos permite comparar las dispersiones de dos poblaciones distintas, donde la mayor dispersión corresponderá al valor del coeficiente de variación mayor, en este caso la mayor dispersión de viabilidad espermática se encuentra en las muestras descongeladas. Además obtuvimos el intervalo de confianza en muestras frescas y descongeladas el cual fue 3.62% y 3.02% respectivamente que nos indican un rango de valores 48.97 ± 3.62 y 32.30 ± 3.02 que contendrían el verdadero parámetro poblacional de las muestras frescas y descongeladas respectivamente con un nivel de confianza del 95%.

Con respecto a la motilidad inicial obtenida en este trabajo fue de 46%, siendo menor a lo reportado por Santiani *et al.* (2005) y Cheuquemán *et al.* (2013) quienes obtuvieron una motilidad inicial de 72% y $\geq 50\%$ respectivamente. Esta diferencia se puede deber a que en estos trabajos las muestras provenían de un núcleo de reproductores a diferencia de nuestro estudio en el cual las muestras provenían de animales de camal. Banda *et al.* (2005) obtuvo una motilidad inicial de 31 % cuyo valor es menor al obtenido en este estudio, esta diferencia se puede deber a que si bien las muestras provenían de animales de camal existen variaciones entre y dentro de individuos (Tibary y Vaughan, 2006). Con respecto a las muestras descongeladas el valor de motilidad obtenido después de la descongelación fue de 24% aparentemente este valor fue mayor al obtenido por Santiani *et al.* (2005), Banda *et al.* (2010) y Santiani *et al.* (2013) quienes obtuvieron 4–20%, 17% y 11% respectivamente, esta disminución se puede deber a que en los trabajos de Santiani *et al.* (2005) y Santiani *et al.* (2013) utilizaron vapores de nitrógeno para realizar la congelación en cambio en este trabajo se utilizó un congelador programable el cual minimiza el daño celular durante la

criopreservación; si bien Banda *et al.* (2010) también utilizó un sistema de enfriamiento controlado y un dilutor a base de leche descremada utilizó el etilenglicol como crioprotector el cual no ofrece buenos resultados de motilidad después del descongelamiento (Choez *et al.*, 2014) y en este estudio se utilizó el crioprotector DMA que ofrece mejores resultados de motilidad después de la congelación (Canorio *et al.*, 2015a).

Según los datos obtenidos en este trabajo se observa que la motilidad espermática también disminuyó significativamente después de la descongelación, esto se debe a que la motilidad es el parámetro más afectado durante el proceso de congelamiento (Canorio *et al.*, 2015a), además que la motilidad se encuentra estrechamente relacionada con la viabilidad espermática (Henkel *et al.*, 2005). Por lo que una disminución en la motilidad espermática a menudo se interpreta como un indicador de la disminución en la viabilidad (Brown y Senger 1980). En este sentido al correlacionar los parámetros de viabilidad espermática y motilidad mediante el coeficiente de correlación de Pearson se obtuvo un r de 0.6737 lo cual nos indica que es una correlación moderada positiva significativa. Sin embargo Mc Laughlin *et al.* (1992) concluyeron que la pérdida de la viabilidad no era la única causa de la disminución de la motilidad espermática en humanos durante la criopreservación; por lo que la viabilidad espermática es un criterio necesario pero insuficiente para predecir la motilidad (De Leeuw *et al.*, 1991; Vetter *et al.*, 1998). Es interesante destacar que en este estudio encontramos mayor porcentaje de espermatozoides vivos que motiles; esto es posible porque existen espermatozoides viables que no poseen motilidad, lo cual explica que aunque los espermatozoides no viables no tienen motilidad no se puede concluir que los espermatozoides viables tendrán necesariamente motilidad (Vetter *et al.*, 1998).

VI. CONCLUSIONES

- ❖ La viabilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca disminuye significativamente luego del proceso de criopreservación.
- ❖ Existe una correlación moderada positiva entre la viabilidad y motilidad espermática.

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Abraham MC, Puhakka J, Ruete A, Al-Essawe EM, de Verdier K, Morrell JM, Båge R. 2016. Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Vet Scand* 2; 58:10.
2. Abraham MC, Verdier K, Båge R, Morell JM. 2017. Semen collection methods in alpacas. *Veterinary Record* 180 (25): 613 – 614.
3. Alarcón V, García W, Bravo PW. 2012. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Inv Vet Perú* 23(1): 58–64.
4. Almela L. 2014. Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos en la raza bovina murciano Levantina: Recongelación de espermatozoides. Tesis Doctoral. Murcia. Universidad de Murcia. 192 p.
5. Ávila–Portillo LM, Madero J, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano JM, Reguero MT. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* Vol. 57 No. 4; (291–300).
6. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. 2010. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 21 (2): 145–153.
7. Boiso I. 2001. Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 18 (4).
8. Boonthai T, Khaopong W, Sangsong J, Vuthiphandchai V, Nimrat S. 2016. Influence of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* on motility,

- viability and morphometry of cryostored silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. *Cryobiology* 73(2):140–146.
9. Bradley L. 1999. Cryopreservation of bovine spermatozoa. Master Science Thesis. Canada. University of Guelph. 124 p.
 10. Bravo PW, Flores D, Ordoñez C. 1997a. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biology of Reproduction*, 520–524.
 11. Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997b. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47 (3):619–626.
 12. Bravo PW, Moscoso R, Alarcon V, Ordoñez C. 2002. Ejaculatory process and related semen characteristics. *Archives of Andrology* 48 (1): 65–72.
 13. Brown DV, Senger PL. 1980. Influence of homologous blood serum on motility and head-to-head agglutination in nonmotile ejaculated bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 23(2): 271–275.
 14. Cabrita E, Robles V, Cuñado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herráez MP. 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology* 50(3): 273–284.
 15. Câmara DR, Guerra MMP. 2011. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.1, p.33–40.
 16. Canorio N, Paredes F, Valdivia M. 2015a. Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 26(3): 434–443.
 17. Canorio N. 2015b. Efecto del proceso de criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPX1 Y GPX4 de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas. Lima. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 79p.
 18. Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero I, Miragaya M. 2012. Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia* 44 Suppl 1: 335–341.
 19. Castillo J. 2005. Citometría de flujo en la evaluación de potencial de membrana y viabilidad celular de *Helicobacter pylori*. Tesis Magister en Ciencias mención Microbiología. Chile. Universidad de Concepción. 144p.

20. Cheuquemán C, Bravo P, Treulén F, Giojalas L, Villegas J, Sánchez R, Risopatrón J. 2012. Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 47(1): 39–43.
21. Cheuquemán C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. 2013. Assessment of Sperm function parameters and DNA fragmentation in ejaculated alpaca sperm (*Lama Pacos*) by flow cytometry. *Reprod Dom Anim* 48(3): 447–453.
22. Choez K, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval S, Santiani A. 2014. Efecto de la concentración de tres crioprotectores sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservados de epidídimo de alpaca. *Spermova* 4(1): 80–82.
23. Choez K, Arriaga I, Terreros M, Condori R, Arroyo G, Huanca W. 2015a. Características del semen de alpacas obtenido por electroeyaculación y su motilidad durante la refrigeración. *Spermova* 5(1): 42–46.
24. Choez K, Evangelista S, Santiani A. 2015b. Comparación de las características seminales de las alpacas Huacaya y Suri. *Spermova* 5(1): 139–143.
25. De Leeuw AM, Den Daas JH, Woelders H. 1991. The fix vital stain method. Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal of Andrology* 12(2):112–118.
26. Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN. 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research* 22(1): 51–57.
27. Director A, Giuliano S, Trasorras V, Carretero MI, Pinto M, Miragaya M. 2007. Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research*, 14: 203–206.
28. Dziekońska A, Świąder K, Koziorowska–Gilun M, Mietelska K, Zasiadczyk Ł, Kordan W. 2017. Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa. *Pol J Vet Sci* 20(1):77–84.
29. Evangelista–Vargas S y Santiani A. 2017. Detection of intracellular reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation during cryopreservation of alpaca spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 52(5): 819–824.

30. Fernández-Baca S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Oficina regional de la FAO. Santiago de Chile.
31. Galindo W. 1995. Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno. Universidad Nacional del Altiplano. 25p.
32. García C, Fontanillas JC, Pérez J, García-Cuenca I, Martín S, Pérez T. 1994. Técnicas de tinción espermática. *Porci* 21: 11–18.
33. Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* 15(6): 620–629.
34. Garner DL, Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction* 53(2): 276–284.
35. Garner D, Hafez E. 2002. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. México: McGraw Hill Interamericana. p. 98–112.
36. Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science* 32: 85–90.
37. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63(2): 445–457.
38. Giuliano S. 2012. Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericano. *Spermova* 2(1): 6–9.
39. Givan A. 2011. Flow cytometry: An introduction. In: Hawley T, Hawley R, eds. *Methods in molecular biology: Flow cytometry protocols*, 2nd ed. Vol 263. Humana Press Inc., Totowa, Nj.
40. Gliozzi TM, Turri F, Manes S, Cassinelli C, Pizzi F. 2017. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal* 11(11): 1975–1982.
41. Hafez E, Hafez B. 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. México: Mc Graw – Hill Interamericana S.A. 519 p.
42. Henkel R, MAAß G, Bödeker RH, Scheibelhut C, Stalf T, Mehnert C, Schuppe HC, Jung A, Schill WB. 2005. Sperm function and assisted reproduction technology. *Reproductive Medicine Biology* 4(1): 7–30.

43. INEI. 2012. Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012. [Internet], [27 agosto 2017]. Disponible en: <http://proyectos.inei.gob.pe/web/DocumentosPublicos/ResultadosFinalesIVCENAGRO.pdf>
44. Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal plasma: an essential review attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology* 33(4): 536–551.
45. Juyena NS, Vencato J, Pasini G, Vazzana I, Stelletta C. 2013. Alpaca semen quality in relation to different diets. *Reproduction Fertility and Development* 25 (4): 683–690.
46. Kanno C, Kang SS, Kitade Y, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. 2016. Simultaneous evaluation of plasma membrane integrity, acrosomal integrity, and mitochondrial membrane potential in bovine spermatozoa by flow cytometry. *Zygote* 24 (4): 529–536.
47. Kershaw–Young CM, Maxwell WM. 2012. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 4), 369–375.
48. Li Y, Kalo D, Zeron Y, Roth Z. 2016. Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote* 24(1):70–82.
49. Love CC. 2016. Modern techniques for semen evaluation. *Vet Clin North Am Equine Pract* 32(3): 531–546.
50. Mc Laughlin EA, Ford WC, Hull MG. 1992. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 95(2): 527–534.
51. Minervini F, Guastamacchia R, Pizzi F, Dell'Aquila ME, Barile VL. 2013. Assessment of different functional parameters of frozen–thawed buffalo spermatozoa by using cytofluorimetric determinations. *Reprod Domest Anim* 48(2): 317–324
52. Morton KM, Bathgate R, Evans G, Maxwell WM. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate–, Tris– and lactose–based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development* 19(7):792–796.
53. Morton KM, Vaughan JL, Maxwell WM. 2008. Continued development of artificial insemination technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT, Australia. 205p.

54. Morton KM, Evans G, Maxwell WM. 2010a. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74 (2): 311–316.
55. Morton KM, Thomson PC, Bailey K, Evans G, Maxwell WM. 2010b. Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. *Reproduction in Domestic Animals* 45(4): 637–643.
56. Muíño R. 2008. Evaluación de la motilidad y vialidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo, identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis doctoral. España. Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal. 157 p.
57. Nishimura H, L'Hernault SW. 2017. Spermatogenesis. *Current Biology* Volume 27, Issue 18, pR988–R994.
58. Pacheco Curie J. 2008. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET*: 2008, Vol. IX, Nº 4 [Internet], [07 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408.html>
59. Paniagua-Chávez CG, Jenkins J, Segovia M, Tiersch TR. 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use fluorescent dyes. *Cryobiology* 53(1): 128–138.
60. Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38(2): 209–222.
61. Paynter E, Baer-Imhoof B, Linden M, Lee-Pullen T, Heel K, Rigby P, Baer B. 2014. Flow cytometry as a rapid and reliable method to quantify sperm viability in the honeybee *Apis mellifera*. *Cytometry A* 85(5): 463–472.
62. Peña FJ, Ortega Ferrusola C, Martín Muñoz P. 2016. New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology* 86(1): 366–372.
63. Peña FJ, Ball BA, Squires EL. 2018. A new method for evaluating stallion sperm viability and mitochondrial membrane potential in fixed semen samples. *Cytometry B Clin Cytom* 94(2): 302–311.
64. Perk K. 1962. Seasonal changes in the glandula bulbo-urethralis of the camel. *Bull Res Counc Isr Sect E Exp Med* 10: 37–44.
65. Ribeiro-Peres A, Munita-Barbosa L, Yumi-Kanazawa M, Mello-Martins MI, Ferreira de Souza F. 2014. Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos

de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. Arch Med Vet 46, 31–38.

66. Rubio–Guillén J, Quintero–Moreno A, González–Villalobos D. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. Revista Científica FCV–LUZ XIX (4): 382–389.
67. Ruiz J. 2011. Producción y tecnología en camélidos sudamericanos. 1ª ed. Huancavelica–Perú. 286p.
68. Salinas P, Pezo F, Sánchez R, Risopatrón J. 2014. Validación de SYBR–14 y 6–CFDA para evaluar la viabilidad e integridad de la membrana plasmática en espermatozoides caninos de raza Chihuahua. Int. J. Morphol 32(1):16–21.
69. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen–thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian J. Androl 7(3): 303–309.
70. Santiani A. 2012. Uso de dos análogos de superóxido dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación en espermatozoides de alpaca. Tesis doctoral. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 122 p.
71. Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, Risopatrón J, Sánchez R. 2013. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. Theriogenology 79(5): 842–846.
72. Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology 65(5): 958–978.
73. Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Analecta Veterinaria 25 (2): 28–35.
74. Suárez M. 2014. Efecto de la suplementación de L–cisteína en el dilutor Tes–Tris–yema, sobre la calidad espermática post–descongelamiento en alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Bióloga Genetista Biotecnóloga. Lima. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 91p.
75. Sumar J y Leyva V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*lama pacos*). Memorias del IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas. Chile.

76. Tejerina F. 2007. Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco. Tesis doctoral. España: Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina y Cirugía Animal. 328 p.
77. Tibary A, Memon MA. 1999. Reproduction in the male South American camelidae. *J Camel Pract Res* 6: 235–248.
78. Tibary A, Vaughan J. 2006. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. *Small Ruminant Research* 61: 283–298.
79. Urquieta B, Cepeda R, Cáceres J, Raggi L, Rojas J. 1991. Seasonal variation in some reproductive parameters of male vicuña in the High Andes of northern Chile. Interregional network for improving the productivity of camelids. 17–20 June, Rabat Institute, Maroc, 115–122.
80. Urquieta B, Flores P, Muñoz C, Bustos–Obregón E, García–Huidobro J. 2005. Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a mating period. *Animal Reproduction Science* 90: 329–339.
81. Valdivia M, Ruíz M, Bermúdez L, Quinteros S, Gonzáles A, Manosalva I, Ponce C, Olazabal J, Dávalos R. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.
82. Vetter CM, Miller JE, Crawford LM, Armstrong MJ, Clair JH, Conner MW, Wise LD, Skopek TR. 1998. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. *Reproductive toxicology* 12(2): 105–114.
83. Vuthiphandchai V, Chomphuthawach S, Nimrat S. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology* 72 (1): 129–138.
84. Wasilewska K, Zasiadczyk Ł, Fraser L, Mogielnicka–Brzozowska M, Kordan W. 2016. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. *Reprod Domest Anim* 51(5): 781–788.
85. Watson PF. 1978. A review of techniques of semen collection in mammals. *Symposium of the Zoological Society of London* 43: 97–126.

86. Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7(4): 871–891.
87. Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60–61: 481–492.
88. Way AL, Griel LC Jr, Killian GJ. 2000. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl* 21(2): 213–219.

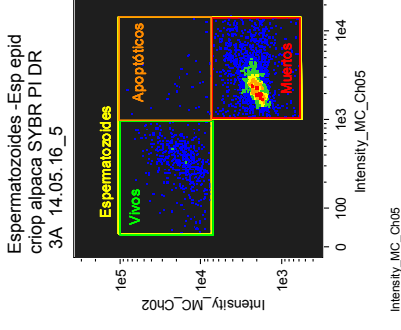
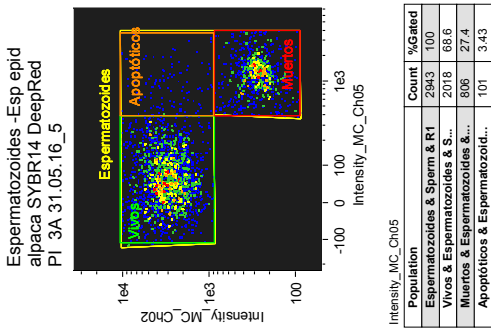
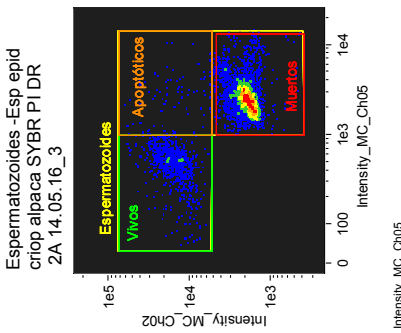
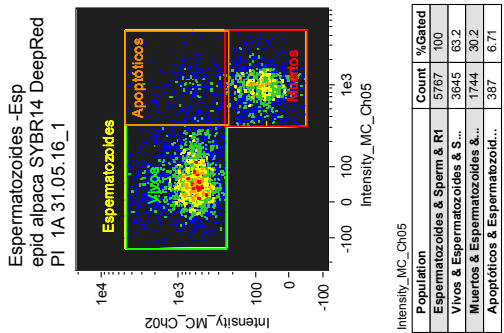
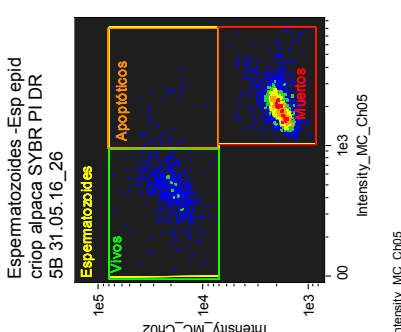
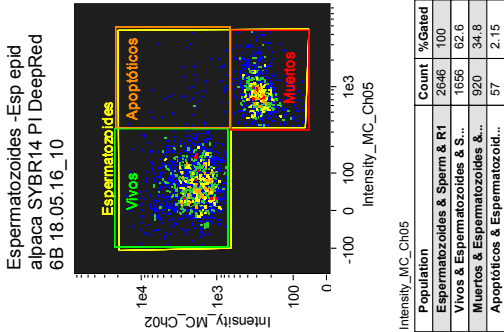
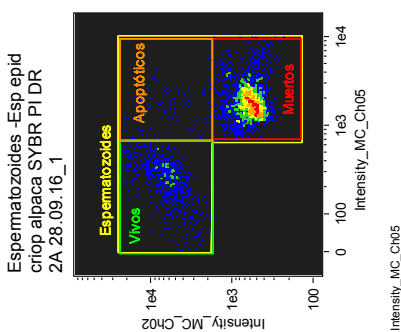
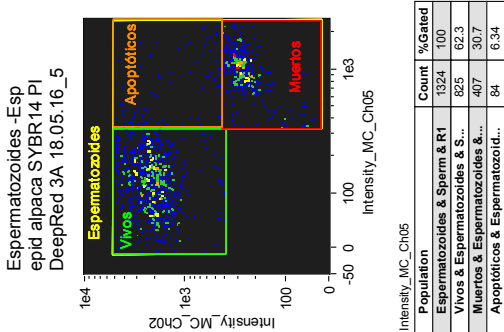
VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Cuadro donde se muestran todos los datos evaluados de cada muestra, y las variables halladas.

Fecha	Código	Peso (g)	Long (cm)	Concentración x10 ^{^6}	Motilidad		Vivos	
					Frescos	Descongelados	Frescos	Descongelados
18-may	2a	18.34	4.40	276	55	25	51.40	17.7
	2b	21.53	4.50	407	60	28	41.90	24.2
	3a	13.60	3.90	126	45	20	62.30	29.1
	3b	12.08	3.60	239	40	25	58.20	34.8
	4a	14.72	3.70	721	35	30	60.30	48.4
	4b	14.51	3.50	506	35	30	62.20	48.6
	6a	13.36	3.60	163	55	15	60.90	22
	6b	12.40	3.50	295	45	25	62.60	28.5
31-may	1a	16.49	3.20	317	45	25	63.20	41.7
	1b	17.86	3.30	125	65	30	50.30	33.6
	2a	21.15	4.00	157	45	28	40.00	30.8
	2b	20.34	3.90	217	45	20	37.70	36.7
	3a	10.55	3.60	64	50	25	68.60	46.1
	4a	13.68	3.00	175	50	30	53.80	44.1
	4b	14.84	3.30	147	50	35	43.30	37.8
	5a	20.15	3.80	101	40	25	50.30	36.2
	5b	19.34	3.90	82	30	15	25.50	19.7
	6a	13.68	3.90	86	50	35	57.10	50.5
	6b	12.84	4.00	79	35	28	36.30	34.8

14-jun	1a	24.07	4.20	47	55	13	47.40	21.4
	1b	24.37	4.50	103	45	20	61.20	18
	2a	21.23	4.00	19	40	25	37.40	17.5
	2b	22.25	4.20	62	45	30	39.30	28.6
	3a	14.81	3.50	31	50	5	40.20	15.7
	3b	15.23	3.20	18	35	10	31.70	33.8
	4a	14.31	3.40	56	40	25	23.30	19.4
	4b	13.99	3.30	18	55	27	36.60	36.2
15-jun	1a	20.79	3.60	202	55	25	57.40	41.3
	1b	18.47	3.80	120	60	35	62.80	49.5
	2a	13.73	3.10	150	40	25	59.40	42.1
	2b	14.83	3.00	96	50	25	62.00	35.3
	3a	12.77	3.30	73	45	18	50.60	33.6
	3b	12.85	3.50	72	40	25	50.10	30
	4a	11.90	3.30	81	40	20	57.60	34.5
	4b	11.97	3.00	98	45	30	51.00	32.9
21-jun	5a	15.49	3.50	119	50	15	44.00	27.1
	5b	13.87	3.20	107	50	25	48.10	32.9
	1a	18.40	3.50	98	40	20	42.70	31.8
	1b	19.00	3.60	89	50	25	29.30	32.9
	2a	15.41	3.30	197	40	25	44.20	21.9
	2b	14.36	3.10	112	45	25	45.40	22.7
	Promedio:	16.23	3.60	152.46	46.10	24.07	48.97	32.30
	Desviación estándar:	3.64	0.41	137.46	7.71	6.50	11.47	9.57
Mediana:	14.83	3.50	107.00	45.00	25.00	25.00	50.30	32.90
	Coficiente de Variación:	22.42%	11.28%	90.16%	16.72%	26.99%	23.42%	29.62%

ANEXO 2. Ejemplos de Dot Plot obtenidos de las muestras evaluadas con SYBR-14 y Ioduro de Propidio (PI).



ANEXO 3. Imágenes de espermatozoides evaluados con SYBR-14/PI, obtenidas mediante citometría de flujo.

